

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年2月13日 (13.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/012099 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 9/10, 5/10, C12Q 1/68, C12P 19/18 裕之 (KITAGAWA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒658-0072 兵庫県神戸市東灘区岡本7-14-5 Hyogo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/07859 (74) 代理人: 原 謙三 (HARA, Kenzo); 〒530-0041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号大和南森町ビル原謙三国際特許事務所 Osaka (JP).
- (22) 国際出願日: 2002年8月1日 (01.08.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2001-234112 2001年8月1日 (01.08.2001) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人新産業創造研究機構 (THE NEW INDUSTRY RESEARCH ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町1丁目5-2 Hyogo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 菅原 一幸 (SUGAHARA, Kazuyuki) [JP/JP]; 〒606-8224 京都府京都市左京区北白川追分町80-1-5 12 Kyoto (JP). 北川 添付公開書類:  
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: CHONDROITIN SYNTHASE

(54) 発明の名称: コンドロイチン合成酵素

(57) Abstract: A vector containing DNA encoding a protein having the amino acid sequence represented by amino acid numbers 47 to 802 in SEQ ID NO:2 or its equivalent. By expressing this DNA, human chondroitin synthase can be obtained. Using this human chondroitin synthase, a sugar chain having a disaccharide repetitive unit of chondroitin can be produced. The above-described DNA or a fragment thereof is usable as a hybridization probe for the human chondroitin synthase.

(57) 要約:

本発明のベクターは、配列番号2におけるアミノ酸番号47～802で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質または同効物をコードするDNAを含む。このDNAの発現によりヒトコンドロイチン合成酵素が得られる。ヒトコンドロイチン合成酵素を用いて、コンドロイチンの二糖繰返し単位を有する糖鎖を製造できる。上記DNAまたはその一部は、ヒトコンドロイチン合成酵素に対するハイブリダイゼーション用プローブとして使用できる。



2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## コンドロイチン合成酵素

## 技術分野

本発明は、コンドロイチン合成酵素をコードするDNAを含むベクター、コンドロイチン合成酵素の製造方法、コンドロイチンの二糖繰返し単位を有する糖鎖の製造方法、ならびに、コンドロイチン合成酵素に対するハイブリダイゼーション用プローブに関する。

## 背景技術

コンドロイチン硫酸はグリコサミノグリカン (GAG) の一種であり、細胞表面や細胞外マトリックスにおいてプロテオグリカンとして存在する。コンドロイチン硫酸は、哺乳類の発生過程における脳において神経系ネットワーク形成に重要な役割を担っていることから (Arch. Biochem. Biophys. 374, 24-34 (2000); Trends Glycosci. Glycotechnol. 12, 321-349 (2000)) 注目を集めるに至っている。

コンドロイチン硫酸は、グルクロン酸残基 (GlcUA) と N-アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc) の繰返し二糖単位から構成される直鎖状のポリマー構造を有しており、独特な 4 糖構造 ( $\text{GlcUA} \beta 1-3\text{Gal} \beta 1-3\text{Gal} \beta 1-4\text{Xyl} \beta 1$ ) を介して、コアタンパク質のセリン残基に共有結合する (Glycoproteins, ed. Gottschalk, A. (Elsevier Science, New York), pp. 491-517 (1972); The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, ed. Lennarz, W. J. (Plenum, New York), pp. 267-

371 (1980))。

GAGの生合成は、UDP-糖から単糖が糖鎖の非還元末端に順々に転移されることによって行われる。ヘパリン／ヘパラン硫酸の二糖繰り返し構造の生合成に関与するグリコシルトランスフェラーゼはウシ血清から精製され、その cDNA クローニングによって、単一のタンパク質が N-アセチルグルコサミン残基 (GlcNAc) と GlcUA の両方のトランスフェラーゼ反応を触媒することが判明している。

一方、コンドロイチン硫酸の二糖単位の生合成に関与するグリコシルトランスフェラーゼは、細菌由来のコンドロイチン合成酵素 (J. Biol. Chem. 275, 24124-24129 (2000)) を除いてまだクローニングされていない。ニワトリの軟骨 (J. Biol. Chem. 272, 14399-14403 (1997)) とウシ血清 (Eur. J. Biochem. 264, 461-467 (1999)) から GlcUA トランスフェラーゼ II (GlcAT-II) および GalNAc トランスフェラーゼ II (GalNAcT-II) が精製されてはいるが、これらの酵素を均一に精製することが困難であるため、cDNA クローニングは未だ行われていない。

本発明は、ヒトコンドロイチン合成酵素をコードする DNA を含むベクター、ヒトコンドロイチン合成酵素の製造方法、コンドロイチンの二糖繰返し単位を有する糖鎖の製造方法、ならびに、ヒトコンドロイチン合成酵素に対するハイブリダイゼーション用プローブを提供することを課題とする。

#### 発明の開示

本発明者は、ヒト cDNA データベースを、特定のキーワードに基づいて検索することにより、ヒトコンドロイチン合成酵素をコードする DN

Aの候補を見出すのに成功するとともに、候補DNAを実際に発現させることにより、候補DNAがヒトコンドロイチン合成酵素をコードするDNAであることを確認し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、以下のものを提供する。

(1) 下記(a)～(c)のいずれかのDNAを保持するベクターであって、前記(b)又は(c)のDNAが、下記(イ)及び(ロ)の触媒活性を有するタンパク質をコードしている前記ベクター(但し、配列番号2におけるアミノ酸番号1～802で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAを含むものを除く)。

(a) 配列番号2におけるアミノ酸番号47～802で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。

(b) 上記(a)に記載のDNA若しくは当該DNAに相補的なDNA又はこれらのDNAの塩基配列の一部を有するDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(c) 配列番号2におけるアミノ酸番号47～802で示されるアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。

(イ) コンドロイチンに、UDP-GalNAcからGalNAcを転移する。

(UDPはウリジン5'-二リン酸を、GalNAcはN-アセチルガラクトサミン残基を示す。)

(ロ) コンドロイチンに、UDP-GlcUAからGlcUAを転移する。

(UDPはウリジン5'-二リン酸を、GlcUAはグルクロン酸残基を示す。)

(2) 前記(a)のDNAが、配列番号1におけるヌクレオチド番号633～2900で示されるDNAである、(1)に記載のベクター。

(3) タンパク質が可溶性である、(1) 又は (2) に記載のベクター。

(4) 発現ベクターである (1) ~ (3) のいずれかに記載のベクター。

(5) 下記 (a) ~ (c) のいずれかの DNA を保持するベクターであって、前記 (b) 又は (c) の DNA が、下記 (イ) 及び (ロ) の触媒活性を有するタンパク質をコードしている前記ベクターによって宿主が形質転換された形質転換体。

(a) 配列番号 2 におけるアミノ酸番号 47 ~ 802 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする DNA。

(b) 上記 (a) に記載の DNA 若しくは当該 DNA に相補的な DNA 又はこれらの DNA の塩基配列の一部を有する DNA と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

(c) 配列番号 2 におけるアミノ酸番号 47 ~ 802 で示されるアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする DNA。

(イ) コンドロイチンに、UDP-GalNAc から GalNAc を転移する。

(UDP はウリジン 5'-二リン酸を、GalNAc は N-アセチルガラクトサミン残基を示す。)

(ロ) コンドロイチンに、UDP-GlcUA から GlcUA を転移する。

(UDP はウリジン 5'-二リン酸を、GlcUA はグルクロン酸残基を示す。)

(6) 前記 (a) の DNA が、配列番号 1 におけるヌクレオチド番号 633 ~ 2900 で示される DNA である、(5) に記載の形質転換体。

(7) タンパク質が可溶性である、(5) 又は (6) に記載の形質転換体。

(8) (5) ~ (7) のいずれか 1 項に記載の形質転換体を生育させ、その生育物からコンドロイチン合成酵素を採取することを特徴とする、コンドロイチン合成酵素の製造方法。

(9) 下記 (A) 又は (B) に示すアミノ酸配列をそのアミノ酸配列中に包含し、かつ下記 (イ) 及び (ロ) の触媒活性を有する酵素タンパク質を含有する、コンドロイチン合成用試薬。

(A) 配列番号 2 におけるアミノ酸番号 47 ~ 802 で示されるアミノ酸配列。(B) 上記 (A) において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は転位したアミノ酸配列。

(イ) コンドロイチンに、UDP-GalNAc から GalNAc を転移する。

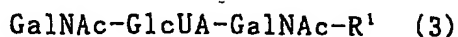
(UDP はウリジン 5'-二リン酸を、GalNAc は N-アセチルガラクトサミン残基を示す。)

(ロ) コンドロイチンに、UDP-GlcUA から GlcUA を転移する。

(UDP はウリジン 5'-二リン酸を、GlcUA はグルクロン酸残基を示す。)

(10) 酵素タンパク質が可溶性である (9) の試薬。

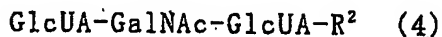
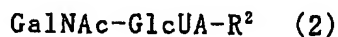
(11) (9) 又は (10) に記載の試薬を、GalNAc 供与体及び下記一般式(1)で示される糖鎖に接触させる工程を少なくとも含む、下記一般式(3)で示される糖鎖の製造方法。



(各式中、GlcUA 及び GalNAc は、いずれも前記と同義である。- はグリコシド結合を、 $R^1$  は任意の基を示す。)

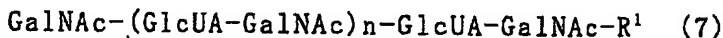
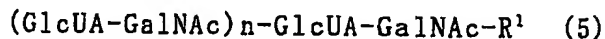


(12) (9) 又は (10) に記載の試薬を、GlcUA 供与体及び下記一般式(2)で示される糖鎖に接触させる工程を少なくとも含む、下記一般式(4)で示される糖鎖の製造方法。



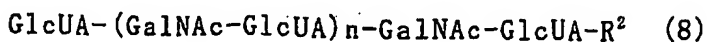
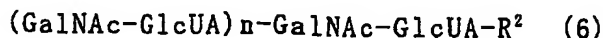
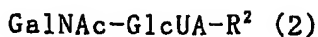
(各式中、GlcUA、GalNAc、及び - は、いずれも前記と同義である。R<sup>2</sup> は任意の基を示す。)

(13) (9) 又は (10) に記載の試薬を、GalNAc 供与体及び GlcUA 供与体、並びに下記一般式(1)で示される糖鎖に接触させる工程を少なくとも含む、下記一般式(5)及び(7)から選ばれる糖鎖の製造方法。



(各式中、n は 1 以上の整数を示し、GlcUA、GalNAc、及び - は、いずれも前記と同義である。また R<sup>1</sup> は任意の基を示す。)

(14) (9) 又は (10) に記載の試薬を、GalNAc 供与体及び GlcUA 供与体、並びに下記一般式(2)で示される糖鎖に接触させる工程を少なくとも含む、下記一般式(6)及び(8)から選ばれる糖鎖の製造方法。



(各式中、n は 1 以上の整数を示し、GlcUA、GalNAc、及び - は、いず

れも前記と同義である。また  $R^2$  はいずれも任意の基を示す。)

(15) 配列番号1におけるヌクレオチド番号495～2900で示される塩基配列又はその一部に相補的な配列を有するハイブリダイゼーション用プローブ。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ヒトコンドロイチン合成酵素(Human)の推定アミノ酸配列と、*C. elegans* (T25233)および *Drosophila* (AE003499)における相同性のあるタンパク質のアミノ酸配列との比較を示す。これらの推定アミノ酸配列は、GENETYX-MAC (バージョン 10) コンピュータプログラムを用いて解析した。黒のボックスと灰色のボックスは、それぞれアミノ酸が三者間で一致する、およびいずれか二者間で一致することを示す。一致の程度を最も高くするために導入したギャップを破線で示す。予測される膜貫通ドメインを四角の枠で囲んだ。保存された DXD モチーフは下線で示した。N-グリコシル化部位として考えられる3ヶ所を星印でマークした。

図2は、ヒトコンドロイチン合成酵素遺伝子のゲノム構成を示す。エキソン領域をボックスで示した。黒のボックスはコード配列を示し、白のボックスは、5'-および 3'-未翻訳配列を示す。翻訳開始コドン(ATG)と終止コドン(TAA)も併せて示した。黒の横線は、イントロンを示す。

図3(a)および(b)は、ヒトコンドロイチン合成酵素反応生成物の特定の結果を示す。図3(a)スーパーデックスペプチド・カラムから回収した、GlcUA トランスフェラーゼ反応生成物を、コンドロイチナーゼ AC-

II、または、 $\beta$ -グルクロニダーゼで消化した。未消化物（黒の四角）、コンドロイチナーゼ AC-II 消化物（黒の丸）、および、 $\beta$ -グルクロニダーゼ消化物（黒塗り三角）を、スーパーデックスペプチド・カラムにアプライし、それぞれの溶出画分（各 0.4 ml）について、放射活性を分析した。矢印は飽和 2 糖 (1, GlcUA  $\beta$  1-3GalNAc)、または、遊離の GlcUA (2, [ $^{14}$ C]GlcUA) の溶出位置を示す。図 3 (b) スーパーデックスペプチド・カラムから回収した、GalNAc トランスフェラーゼ反応生成物をコンドロイチナーゼ AC-II で消化した。未消化物（黒の四角）、または、コンドロイチナーゼ AC-II 消化物（黒の丸）をスーパーデックスペプチド・カラムにアプライし、それぞれの溶出画分（各 0.4 ml）について、放射活性を分析した。矢印は飽和 2 糖 (1, GlcUA  $\beta$  1-3GalNAc)、または、遊離の GalNAc (2, [ $^3$ H]GalNAc) の溶出位置を示す。

図 4 は、ヒトの組織におけるコンドロイチン合成酵素のノーザンブロット分析の結果（電気泳動写真）を示す。各種ヒト組織由来の RNA に対し、コンドロイチン合成酵素のプロンプを用いてハイブリダイゼーションを行った。レーン 1 は脳、レーン 2 は心臓、レーン 3 は骨格筋、レーン 4 は結腸、レーン 5 は胸腺、レーン 6 は脾臓、レーン 7 は腎臓、レーン 8 は肝臓、レーン 9 は小腸、レーン 10 は胎盤、レーン 11 は肺、レーン 12 は末梢血白血球である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を発明の実施の形態により詳説する。

#### (1) 本発明ベクター

本発明ベクターは、下記 (a) ~ (c) のいずれかの DNA を保持す

るベクターである（但し、配列番号 2 におけるアミノ酸番号 1～802 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA を含むものを除く）。

（a）配列番号 2 におけるアミノ酸番号 47～802 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする DNA。

（b）上記（a）に記載の DNA 若しくは当該 DNA に相補的な DNA 又はこれらの DNA の塩基配列の一部を有する DNA と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

（c）配列番号 2 におけるアミノ酸番号 47～802 で示されるアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする DNA。

前記（b）、又は（c）の DNA は、下記（イ）及び（ロ）の触媒活性を有するタンパク質をコードしている。

（イ）コンドロイチンに、UDP-GalNAc から GalNAc を転移する。

（ロ）コンドロイチンに、UDP-GlcUA から GlcUA を転移する。

なお、コンドロイチンは、GlcUA と GalNAc の繰り返し二糖単位からなるポリマーであり、その非還元末端が GlcUA であるものと GalNAc であるものとの双方を含んでいる。よって、GalNAc の転移は非還元末端が GlcUA であるコンドロイチンに対するものであり、GlcUA の転移は非還元末端が GalNAc であるコンドロイチンに対するものであると言える。

後記実施例に記載したように、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号 47～802 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質は、ヒトコンドロイチン合成酵素の酵素活性を有することが確認されている。配列番号 2 に示すアミノ酸配列のアミノ酸番号 1～46 で示されるアミ

ノ酸配列の部分は、膜貫通領域を含むと考えられる。よって、アミノ酸番号1～46で示されるアミノ酸配列をコードする配列を含まないDNAを用いることにより、可溶性形態でコンドロイチン合成酵素を発現させることができる点で好ましい。すなわち、「アミノ酸番号47～802で示されるアミノ酸配列をコードするDNAであって、アミノ酸番号1～46で示されるアミノ酸配列をコードする配列を含まないDNA」を保持するベクターが好ましい。

天然に存在するタンパク質には、それをコードするDNAの多形や変異の他、生成後のタンパク質の細胞内および精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中にアミノ酸の置換、欠失、挿入又は転位等の変異が起こりうるが、それにもかかわらず変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に若干の差違があってもその機能については大きな違いが認められないタンパク質をコードするDNAを保持するベクターは、本発明ベクターに包含される。人為的にタンパク質のアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合も同様であり、この場合にはさらに多種多様の変異体を作製することが可能である。例えば、ヒトインターロイキン2 (IL-2) のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリンに置換したタンパク質がインターロイキン2活性を保持することが知られている (Science, 224, 1431 (1984))。また、ある種のタンパク質は、活性には必須でないペプチド領域を有していることが知られている。例えば、細胞外に分泌されるタンパク質に存在するシグナルペプチドや、プロテアーゼの前駆体等に見られるプロ配列などがこれにあたり、これらの領域のほとんどは翻訳後、または活性型タンパク質への転換に際して除去

される。このようなタンパク質は、一次構造上は異なった形で存在しているが、最終的には同等の機能を有するタンパク質である。このようなタンパク質をコードするDNAとして上記(b)及び(c)のDNAが挙げられる。

上記(b)における「ストリンジेंटな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう(Sambrook, J. et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等参照)。「ストリンジेंटな条件」として具体的には、50%ホルムアミド、4×SSC、50mM HEPES (pH7.0)、10×Denhardt's solution、100 µg/ml サケ精子 DNA を含む溶液中、42℃でハイブリダイズさせ、次いで室温で2×SSC、0.1% SDS 溶液、50℃下で 0.1×SSC、0.1% SDS 溶液で洗浄する条件が挙げられる。

上記(c)における、「数個のアミノ酸」とは、後述する(イ)及び(ロ)の触媒活性が失われない程度の変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、例えば800アミノ酸残基からなるタンパク質の場合、4～40程度、好ましくは4～20、より好ましくは4～10の数を示す。

なお、本発明ベクターに保持されるDNAとして、遺伝暗号の縮重による種々の異なった塩基配列を有するDNAが存在することは、当業者であれば容易に理解されるところである。

前記(イ)及び(ロ)の触媒活性は、グリコシルトランスフェラーゼの一般的なアッセイ方法によって検出することができる。

具体的には、後記実施例に示すように、UDP-N-アセチルガラクトサミン(UDP-GalNAc)を供与体として用い、コンドロイチンへのGalNAc

の転移反応を利用した測定方法、及び、UDP-グルクロン酸 (UDP-GlcUA) を供与体として用い、コンドロイチンへの GlcUA の転移反応を利用した測定方法を用いることによってそれぞれ測定できる。よって当業者であれば、これらの転移活性の有無を指標として、該活性を実質的に害さない1つ以上の、特に1もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を容易に選択することができる。また、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAの中から前記 (イ) 及び (ロ) の触媒活性を有するタンパク質をコードするDNAを容易に選択できる。

なお、ここで用いるコンドロイチンには、非還元末端が GlcUA であるものと、GalNAc であるものとの双方が含まれることは、前記で説明した通りである。

また、前記 (b) 又は (c) のDNAによってコードされるタンパク質は、さらに下記 (ハ) の全ての性質を有していることが好ましい。

(ハ) 下記のいずれの受容体にも、下記の供与体 (カッコ内) から実質的に単糖を転移しない。

- ・ Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl (UDP-GlcUA)
- ・ GlcUA  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl  $\beta$  1-O-Ser (UDP-GalNAc)
- ・  $\alpha$ -トロンボモジュリン (UDP-GalNAc)
- ・ ヒツジ顎下腺アシアロムチン (UDP-Gal)
- ・ GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc (UDP-Gal)

なお、 $\alpha$ -トロンボモジュリンには、GlcUA  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl からなる4糖が含まれている。またヒツジ顎下腺アシアロムチンには、GalNAc  $\alpha$  1-O-Ser/Thr が含まれている。

なお、上記において、Gal はガラクトース残基を、Xyl はキシロース

残基を、Ser はセリン残基を、Thr はスレオニン残基をそれぞれ示し、その他は前記と同義である。

本発明ベクターに保持されるDNAによりコードされるタンパク質は可溶性タンパク質であることが好ましい。可溶性タンパク質とは、通常には膜貫通ドメインを有さないタンパク質であり、発現させたときに水性溶媒等に可溶であり、精製が容易なことから好ましいものである。

本発明ベクターに保持されるDNAは、配列番号2におけるアミノ酸番号1～46で示されるアミノ酸配列をコードする配列を含まないものが好ましく、最も好ましいDNAは、配列番号1におけるヌクレオチド番号633～2900で示されるDNAである。

またこのベクターは、後述するコンドロイチン合成酵素の製造方法に好ましく用いられることから、発現ベクターであることが好ましい。

例えば、アミノ酸番号47～802で示されるアミノ酸配列をコードするDNA（アミノ酸番号1～46で示されるアミノ酸配列をコードする配列を含まない）を保持する発現ベクターは、以下の手法により調製することができる。

#### < A > ベクターに組み込むDNAの調製

HUGE プロテインデータベースにおいて「KIAA0990」として特定されるcDNAクローン（GenBank アクセション番号；AB023207）を入手し、これを鋳型として、XhoI 部位を含む5'-プライマー（5'-CCCTCGAGGGGCTGCCGGTCCGGGC-3'（配列番号3））、および、終止コドンから138bp 下流に位置するXhoI 部位を含む3'-プライマー（5'-CCCTCGAGCAATCTTAAAGGAGTCCTATGTA-3'（配列番号4））を用いてPCRで増幅を行う。



PCR 反応は一般的な方法を用いることができるが、例えば 5(v/v)ジメチルスルホキシド中で、Pfu ポリメラーゼ (Stratagene 社、ラホヤ、カリフォルニア州) を用いて、94° C で 30 秒、55° C で 30 秒、および 72° C で 180 秒のサイクルを 34 サイクル行うことにより実施することができる。

#### < B > ベクターへの DNA 断片の導入

上記手法によって得られた DNA を公知のベクターに導入することで本発明ベクターを調製することができる。

上記 DNA を導入するベクターとしては、例えば、導入した DNA を発現させることが可能な適当な発現ベクター (ファージベクター或いはプラスミドベクター等) を使用することができ、本発明ベクターを組み込む宿主細胞で上記 DNA を発現することが可能なベクターを適宜選択する。このような宿主-ベクター系としては、COS 細胞、3LL-HK46 細胞などの哺乳類細胞と、pGIR201 (Kitagawa, H., and Paulson, J. C. (1994) J. Biol. Chem. 269, 1394-1401)、pEF-BOS (Mizushima, S., and Nagata, S. (1990) Nucleic Acid Res. 18, 5322)、pCXN2 (Niwa, H., Yamanura, K. and Miyazaki, J. (1991) Gene 108, 193-200)、pCMV-2 (イーストマン コダック (Eastman Kodak) 製)、pCEV18、pME18S (丸山ら, Med. Immunol., 20, 27 (1990)) 又は pSVL (ファルマシア バイオテック社製) 等の哺乳類細胞用発現ベクターの組み合わせ、大腸菌 (*E. coli*) と、pTrcHis (インビトロゲン社製)、pGEX (ファルマシア バイオテック社製)、pTrc99 (ファルマシア バイオテック社製)、pKK233-3 (ファルマシア バイオテック社製)、pEZZZ18 (ファルマシア バイオテック社製)、pCH110 (ファルマシア バイオテック社製)、pET (ストラタジ

ーン社製)、pBAD (インビトロゲン社製)、pRSET (インビトロゲン社製)、及び pSE420 (インビトロゲン社製) 等の原核細胞用の発現ベクターとの組み合わせの他、宿主細胞として昆虫細胞、酵母、枯草菌などが例示され、これらに対応する各種ベクターが例示される。上述の宿主ベクター系の中でも特に哺乳類細胞と pEF-BOS との組み合わせが好ましい。

また、上記 DNA を組み込むベクターは、組み込んだ DNA がコードするタンパク質とマーカープепチドとの融合タンパク質を発現するように構築されたものを用いることもでき、本発明ベクターを用いて発現されるコンドロイチン合成酵素を精製する場合には特に好ましい。上記マーカープепチドとしては例えばプロテイン A、インスリンシグナル配列、His、FLAG、CBP (カルモジュリン結合タンパク質)、GST (グルタチオン S-トランスフェラーゼ) などが挙げられる。プロテイン A と融合させれば容易にアフィニティー精製することが可能となり、インスリンシグナル配列等と融合させれば酵素を細胞外 (培地等) に分泌させることができる。

いずれのベクターを用いる場合であっても常法に従って、上記 DNA とベクターとを連結することが可能なように例えば制限酵素などによって処理し、必要に応じて平滑化や粘着末端の連結を行った後、前記 DNA とベクターとの連結をすることが可能である。

具体的には、例えば上記< A >で得られた DNA (PCR 断片) を XhoI で消化し、断片の両端をクレノウ断片 (New England Biolabs, Beverly, マサチューセッツ州)、dCTP 及び dTTP を用いて部分的に充填し、BamHI で消化した pGIR201protA (J. Biol. Chem., 269, 1394-1401 (1994)) ベクターについても同様に dATP と dGTP で部分的に充填する。これにより

得られた断片を pGIR201protA にサブクローニングし、上記< A >で得られたDNAによってコードされるDNAと、ベクター中のインスリンシグナル配列およびプロテインA配列とを融合させる。この融合タンパク配列を含む NheI 断片を、発現ベクターpEF-BOS(Nucleic Acid Res., 18, 5322 (1990))の XbaI 部位に挿入することにより、インスリンシグナル配列及びプロテインAと融合したコンドロイチン合成酵素を発現する発現ベクターを得ることができる。

## (2) 本発明形質転換体

本発明形質転換体は、本発明ベクター（配列番号2におけるアミノ酸番号1～802で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAを含むものも含む）によって宿主が形質転換された形質転換体である。

ここでいう「宿主」は、本発明ベクターによる組換えが可能なものであればよいが、本発明ベクターの保持するDNA又はそのDNAを組み込んだ組換えベクターの機能を発揮できるものが好ましい。宿主としては、動物細胞、植物細胞、微生物細胞（菌体）が包含され、COS細胞（COS-1細胞、COS-7細胞等）、3LL-HK46細胞などの哺乳類細胞、大腸菌（E. coli）、昆虫細胞、酵母、枯草菌などが例示される。宿主は、本発明ベクターにあわせて適宜選択することができるが、例えば pEF-BOSをベースとする本発明ベクターを用いる場合には哺乳類由来の細胞を選択することが好ましく、中でもCOS細胞が好ましい。

宿主の本発明ベクターによる形質転換は、常法によって行うことができる。例えば、市販のトランスフェクション用試薬を用いる方法や、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法等によって本発明ベ

クターを宿主に導入し、形質転換を行うことができる。

このようにして得られる本発明形質転換体は、後述する通り、コンドロイチン合成酵素の製造等に用いることができる。

### (3) コンドロイチン合成酵素の製造方法

本発明のコンドロイチン合成酵素の製造方法は、本発明形質転換体を生育させ、その生育物からコンドロイチン合成酵素を採取することを特徴とする。

ここで「生育」とは、本発明形質転換体である細胞や微生物自体の増殖、本発明形質転換体である細胞を組み込んだ動物、昆虫等の生育を含む概念である。また、ここでいう「生育物」とは、本発明形質転換体を生育させた後の培地（培養液の上清）及び培養された宿主細胞、分泌物、排出物等を包含する概念である。

生育の条件（培地や培養条件等）は、用いる宿主に合わせて適宜選択される。

この製造方法によれば、用いる形質転換体に応じて種々の形態のコンドロイチン合成酵素を産生させることができる。

例えば本発明ベクターとして、配列番号2におけるアミノ酸番号47～802で示されるアミノ酸配列をコードするDNAを保持する発現ベクターによって形質転換された形質転換体を生育させれば、可溶性のコンドロイチン合成酵素が産生される。

また、配列番号2におけるアミノ酸番号1～802で示されるアミノ酸配列をコードするDNAを保持する発現ベクターによって形質転換された形質転換体を生育させれば、不溶性（膜結合性）のコンドロイチン合成酵素が産生される。

さらに、マーカーペプチドとの融合タンパク質を発現するよう構築された発現ベクターによって形質転換された形質転換体を生育させれば、マーカーペプチドと融合したコンドロイチン合成酵素が産生される。

生育物からのコンドロイチン合成酵素の採取は、産生されるコンドロイチン合成酵素の形態に応じて、公知のタンパク質の抽出・精製方法によって行うことができる。

例えばコンドロイチン合成酵素が、培地（培養液の上清）中に分泌される可溶性の形態で産生される場合には、培地を採取し、これをそのままコンドロイチン合成酵素として用いてもよい。またコンドロイチン合成酵素が細胞質中に分泌される可溶性の形態、又は不溶性（膜結合性）の形態で産生される場合には、窒素キャビテーション装置を用いる方法、ホモジナイズ、ガラスビーズミル法、音波処理、浸透ショック法、凍結融解法等の細胞破碎による抽出、界面活性剤抽出、またはこれらの組み合わせ等の処理操作によってコンドロイチン合成酵素を抽出することができ、抽出物をそのままコンドロイチン合成酵素として用いてもよい。

これらの培地や抽出物から、コンドロイチン合成酵素をさらに精製することもでき、かつ好ましい。精製は、不完全な精製（部分精製）であっても、完全な精製であってもよく、コンドロイチン合成酵素の使用目的等に応じて適宜選択することができる。

精製方法として具体的には、例えば硫酸アンモニウム（硫安）や硫酸ナトリウム等による塩析、遠心分離、透析、限外濾過法、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過法、ゲル浸透クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等や、これらの組

み合わせ等の処理操作が挙げられる。

例えば、コンドロイチン合成酵素をプロテインAとの融合タンパク質として產生させれば、IgGを結合させた固相を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって簡便に精製することができる。同様に、His との融合タンパク質として產生させれば、磁性ニッケルを結合させた固相を用いることができ、FLAG との融合タンパク質として產生させれば抗 FLAG 抗体を結合させた固相を用いることができる。さらにインスリンシグナルと融合させることにより、細胞破碎等の抽出操作が不要となる。

精製されたコンドロイチン合成酵素の製造は、アミノ酸配列、作用、基質特異性等を分析することによって確認できる。

#### (4) 本発明試薬

本発明試薬は、下記 (A) 又は (B) に示すアミノ酸配列をその配列中に包含し、かつ下記 (イ) 及び (ロ) の触媒活性を有する酵素タンパク質を含有する、コンドロイチン合成用試薬である。

(A) 配列番号2におけるアミノ酸番号47～802で示されるアミノ酸配列。(B) 上記 (A) において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は転位したアミノ酸配列。

(イ) コンドロイチンに、UDP-GalNAc から GalNAc を転移する。

(ロ) コンドロイチンに、UDP-GlcUA から GlcUA を転移する。

(A) 及び (B) のアミノ酸配列は、本発明ベクターに関して説明した (a) 及び (c) の DNA によりコードされるアミノ酸配列であり、上記 (a) 及び (c) の DNA がコードするアミノ酸配列に関して説明した通りである。(イ) 及び (ロ) については、本発明ベクターに関し

て説明した通りである。

本発明試薬に含有される酵素タンパク質には、配列番号2におけるアミノ酸番号47～802で示されるアミノ酸配列からなるもののみならず、アミノ酸番号1～802で示されるアミノ酸配列からなるもの等も含まれる。

本発明試薬は、上記(A)又は(B)の酵素タンパク質(コンドロイチン合成酵素)が有する「GalNAcの転移作用」及び「GlcUAの転移作用」を、コンドロイチンの合成試薬として応用したものである。

本発明試薬はコンドロイチンの合成に用いるものである。本明細書において「コンドロイチンの合成」あるいは「コンドロイチン合成」とは、コンドロイチンに糖を転移・付加して、コンドロイチンの糖鎖を延長することを含む概念である。

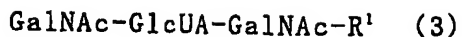
本発明試薬の形態も限定されず、溶液形態、凍結形態、凍結乾燥形態のいずれの形態であってもよい。またコンドロイチン合成酵素の活性に影響を与えない限りにおいて他の成分(例えば、試薬的に許容される担体等)を含んでいてもよい。

#### (5) 糖鎖の製造方法

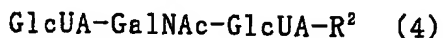
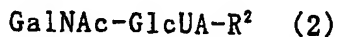
本発明の糖鎖の製造方法は、いずれも本発明試薬を用いるものであり、使用する糖供与体と受容体基質に応じて、以下の4つに分けることができる。

<1> 本発明試薬を、GalNAc 供与体及び下記一般式(1)で示される糖鎖に接触させる工程を少なくとも含む、下記一般式(3)で示される糖鎖の製造方法。

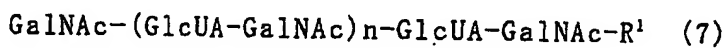
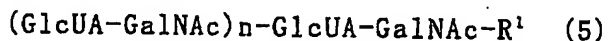




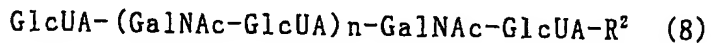
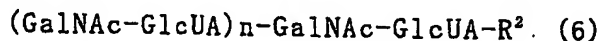
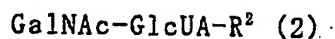
< 2 > 本発明試薬を、GlcUA 供与体及び下記一般式(2)で示される糖鎖に接触させる工程を少なくとも含む、下記一般式(4)で示される糖鎖の製造方法。



< 3 > 本発明試薬を、GalNAc 供与体及び GlcUA 供与体、並びに下記一般式(1)で示される糖鎖に接触させる工程を少なくとも含む、下記一般式(5)及び(7)から選ばれる糖鎖の製造方法。



< 4 > 本発明試薬を、GalNAc 供与体及び GlcUA 供与体、並びに下記一般式(2)で示される糖鎖に接触させる工程を少なくとも含む、下記一般式(6)及び(8)から選ばれる糖鎖の製造方法。



GalNAc 供与体としては、ヌクレオシドジリン酸-GalNAc が好ましく、UDP-GalNAc が特に好ましい。

GlcUA 供与体としては、ヌクレオシドジリン酸-GlcUA が好ましく、UDP-GlcUA が特に好ましい。

「接触」のさせ方は、本発明試薬中に含まれるコンドロイチン合成酵素、供与体、及び受容体(糖鎖)の分子が相互に接触して酵素反応が生



ずる限りにおいて特に限定されない。例えばこれら三者が溶解した溶液中で接触させてもよい。また本発明試薬中に含まれるコンドロイチン合成酵素を適当な固相（ビーズ等）に結合させた固定化酵素や、限外濾過膜、透析膜等を用いる膜型リアクター等を用いて連続的に酵素反応させることもできる。また、PCT国際公開パンフレットWO 00/27437号に記載された方法と同様に、受容体を固相に結合させて酵素反応させることもできる。さらに、供与体を再生（合成）するバイオリアクターを組み合わせる用いてもよい。

また、上記<3>及び<4>においては、必ずしも GalNAc 供与体と GlcUA 供与体とを同時に本発明試薬及び上記一般式(1)又は(2)で示される糖鎖に接触させる必要はなく、これら供与体を交互に接触させてもよい。

酵素反応させる条件は、コンドロイチン合成酵素が作用する条件である限りにおいて特に限定されないが、中性pH付近（例えば pH6.5 程度）で反応させることが好ましく、当該pH下で緩衝作用を有する緩衝液中で反応を行うことがより好ましい。またこのときの温度もコンドロイチン合成酵素の活性が保持されている限りにおいて特に限定されないが、30～40℃程度（例えば37℃）が例示される。またコンドロイチン合成酵素の活性を増加させる物質がある場合には、その物質を添加してもよい。例えばMn<sup>2+</sup>等を共存させることが好ましい。反応時間は、使用する本発明試薬、供与体及び受容体の量、並びにその他の反応条件に応じて当業者が適宜決定することができる。

生成物からのコンドロイチンの単離等は、公知の方法によって行うことができる。

また、本発明試薬（コンドロイチン合成酵素）と、硫酸基転移酵素（スルホトランスフェラーゼ）とを組み合わせる用いることによって、コンドロイチン硫酸を製造することもできる。

例えば、上記の糖鎖の製造方法（コンドロイチンの製造方法）において、さらに硫酸基供与体（3'-ホスホアデノシン 5'-ホスホ硫酸(PAPS)など）と硫酸基転移酵素を共存せしめ、コンドロイチンの生成と硫酸基の転移とを同時に行うことにより、コンドロイチン硫酸を製造することができる。硫酸基転移酵素は、前記と同様に適当な固相（ビーズ等）に結合させた固定化酵素として用いてもよく、限外濾過膜、透析膜等を用いる膜型リアクターを用いて、連続的に反応させてもよい。この際、硫酸基供与体を再生（合成）するバイオリアクターを組み合わせる用いてもよい。

また、本発明ベクターで形質転換された宿主（本発明形質転換体）において、直接コンドロイチンを生成させることにより、コンドロイチンを製造することもできる。

さらに、本発明ベクターと硫酸基転移酵素をコードするcDNAとを共に宿主に導入し、宿主（硫酸基転移酵素をコードするcDNAを含有する本発明形質転換体）において、コンドロイチン合成酵素と硫酸基転移酵素とを同時に発現させ、宿主において直接コンドロイチン硫酸を製造することができる。

ここで用いることができる硫酸基転移酵素（又はそれをコードするcDNA）は、コンドロイチンに硫酸基を転移する酵素（又はそれをコードするcDNA）であればよく、所望のコンドロイチン硫酸のタイプに応じて、公知のものから適宜選択することができる。また、硫酸基の転

移位置が異なる2種類以上の硫酸基転移酵素（又はそれをコードするcDNA）を組み合わせて用いてもよい。

硫酸基転移酵素の一例として、例えばコンドロイチン6-〇-硫酸基転移酵素（J. Biol. Chem., 275(28), 21075-21080 (2000)）を挙げることができるが、これに限定されず、他の酵素を用いることもできる。

#### （6）本発明プローブ

本発明プローブは、配列番号1におけるヌクレオチド番号495～2900、好ましくは633～2900で示される塩基配列又はその一部に相補的な配列を有するハイブリダイゼーション用プローブである。

本発明プローブは、配列番号1におけるヌクレオチド番号495～2900、好ましくは633～2900で示される塩基配列又はその一部に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを作成し、これをハイブリダイゼーションに適した標識（例えば、放射性同位体）で標識することにより得ることができる。

オリゴヌクレオチドの長さは、本発明プローブを用いるハイブリダイゼーションの条件によって適宜選定される。

本発明プローブは、コンドロイチン硫酸の生物学的機能を調べる有用な道具となることが期待される。コンドロイチン硫酸は、広く発現し、かつ、多くの組織、特に脳において重要な役割を果たしているからである。このプローブはさらに、遺伝子と疾患との関連を探るのにも有用と考えられる。

#### 【実施例】

以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

#### 【実施例1】

(1) 新規ヒトグリコシルトランスフェラーゼ cDNA のインシリコ・クローニング(in silico cloning)

かずさ DNA 研究所 (千葉県) の HUGE プロテインデータベース (HYPER LINK <http://www.kazusa.or.jp/huge/>) において、「一個の膜貫通ドメイン(one transmembrane domain)」と「ガラクトシルトランスフェラーゼファミリー(galactosyltransferase family)」をキーワードとしてスクリーニングを行った。この結果、一つのクローン(KIAA0990)が特定された(GenBank アクセション番号; AB023207)。このクローンは、塩基配列の解析から、494bp の 5'-未翻訳領域、N-グリコシル化される可能性がある 3つの部位 (図 1 中の星印) を含む 802 個のアミノ酸から成るタンパク質をコードする 2406 bp の、単一のオープンリーディングフレーム、および、1.7kb であってポリアデニル化シグナルを有すると予想される 3'-未翻訳領域を含むことが明らかになった。塩基配列及びその塩基配列から推測されるアミノ酸配列を配列番号 1 に、アミノ酸配列のみを配列番号 2 に示す。

このクローンをかずさ DNA 研究所から入手した。ノーザンブロット分析 (実施例 2 参照) により、このクローンに相当する mRNA は、各種ヒト組織において、約 5.0 kb 長を有することが明らかになった。このことから、上記クローンの cDNA はほぼ全長であることが示唆された。推定されるアミノ酸配列は、91,728-Da のタンパク質に相当する。予想される翻訳開始部位は、Kozak の共通開始配列(Nucleic Acids Res. 12, 857-872 (1984))と一致し、かつ、インフレーム終止コドンが、割り当てられた開始 ATG コドンの上流に存在した。

Kyte-Doolittle のヒドロパシー分析(J. Mol. Biol. 157, 105-132

(1982))により、NH<sub>2</sub>末端領域に 17 個のアミノ酸残基からなる、1 個の顕著な疎水性領域が存在することが明らかになった。これは、今日までにクローンされている多くの、ゴルジ局在性グリコシルトランスフェラーゼに特徴的な、II 型膜貫通形態を持つことを予想させるものである(図 1)。

データベース検索により、このアミノ酸配列は、アミノ末端側では、ヒトのコア 1 UDP-Gal:GalNAc  $\alpha$ -R  $\beta$  1,3-Gal トランスフェラーゼ (GenBank アクセション番号 AF155582) に僅かに相同性を有しており、カルボキシル末端側ではヒトの UDP-Gal:GlcNAc  $\beta$ -R  $\beta$  1,4-Gal トランスフェラーゼ II (GenBank アクセション番号 AB024434) に僅かに相同性を有していた。相同性を有するグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子に特徴的な点として、異なるメンバーは供与体または受容体に関して異なった特異性を有するにも拘わらず、形成される糖鎖の結合様式はしばしば保存されている、という点を挙げることができる (Biochim. Biophys. Acta 1254, 35-53 (1999))。

したがって、コードされるアミノ酸配列の特徴から、この同定された遺伝子の産物は、 $\beta$  1,3-GlcUA トランスフェラーゼ (GlcAT-II) および  $\beta$  1,4-GalNAc トランスフェラーゼ (GalNAcT-II) の両方の活性を有する可能性が示唆された。さらに、今回同定されたヒト遺伝子の同族体が、*Caenorhabditis elegans* または *Drosophila* ゲノムの中に見出された。ヒト、*C. elegans* および *Drosophila* 由来のタンパク質配列の相互の一致度を図 1 に示す。ヒトの配列は、*C. elegans* や *Drosophila* に対して、それぞれ、36 および 42 の相同性を有していた。これら 3 つのタンパク質は、いずれもアミノ末端側に DDD を、カルボキシル末端側に DVD を含

んでおり（図1）、多くのグリコシルトランスフェラーゼに見られる、保存された DXD モチーフに相当すると考えられる（Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 7945-7950 (1998)）。

さらに、ヒトゲノムプロジェクトのデータベース検索を行った。この結果、この cDNA 配列と同一のゲノム配列（アクセス番号 NT010274.3）が示された。この cDNA とゲノム配列とを比較することにより、この遺伝子のゲノム構造と染色体上の位置が明らかになった。この遺伝子は 40 kb を超える長さを持ち、そのコード領域は、図2に示すように、三つの不連続なエキソンに分割されていた。イントロン／エキソン接合部は、GT/AG ルールに従っており、その両側は保存配列によって挟まれていた。この遺伝子は、ヒトの第15番染色体に存在する。

（2）可溶性の新規グリコシルトランスフェラーゼをコードする DNA を含むプラスミドの構築

この新規なグリコシルトランスフェラーゼにおいて、N-末端の 46 個のアミノ酸残基を欠いたグリコシルトランスフェラーゼの cDNA を PCR で増幅した。すなわち、KIAA0990 cDNA を鋳型として、XhoI 部位を含む 5'-プライマー（5'-CCCTCGAGGGGCTGCCGGTCCGGGC-3'（配列番号3））、および、終止コドンから 138bp 下流に位置する XhoI 部位を含む 3'-プライマー（5'-CCCTCGAGCAATCTTAAAGGAGTCCTATGTA-3'（配列番号4））を用いて増幅を行った。PCR 反応は、5(v/v)ジメチルスルホキシド中で、Pfu ポリメラーゼ（Stratagene 社、ラホヤ、カリフォルニア州）を用いて、94° C で 30 秒、55° C で 30 秒、および 72° C で 180 秒のサイクルを 34 サイクル行った。この PCR 産物を XhoI で消化し、断片の両端をクレノウ断片（New England Biolabs 社、Beverly、マサチューセッツ州）、

dCTP 及び dTTP を用いて部分的に充填した。BamHI で消化した pGIR201protA(J. Biol. Chem. 269, 1394-1401 (1994))ベクターについても同様に、dATP と dGTP で部分的に充填した。得られた断片を pGIR201protA にサブクローニングし、この新規グリコシルトランスフェラーゼと、ベクター中のインスリンシグナル配列およびプロテイン A 配列とを融合させた。上記の融合タンパク配列を含む NheI 断片を、発現ベクター pEF-BOS(Nucleic Acids Res. 18, 5322 (1990))の XbaI 部位に挿入し、発現プラスミドを得た。

この発現プラスミドは、グリコシルトランスフェラーゼの最初の 46 個のアミノ酸が、切断可能なインスリンシグナル配列と、プロテイン A の IgG 結合ドメインとによって置換されたタンパク質、すなわち、インスリンシグナル配列及びプロテイン A と融合した可溶性コンドロイチン合成酵素をコードする。

### (3) 可溶性の新規グリコシルトランスフェラーゼの発現および酵素アッセイ

FuGENE (商標) 6 (Roche Molecular Biochemicals、東京) を用い、メーカーの説明書に従って、発現プラスミド (6.7  $\mu$ g) を 100 mm プレート上で COS-1 細胞にトランスフェクトさせた。トランスフェクションから 2 日後に、培養液 1 ml を採取して、10  $\mu$ l の IgG-セファロース (Amersham Pharmacia Biotech) と共に 4° C で 1 時間インキュベートした。遠心して回収した IgG-セファロースのビーズをアッセイ緩衝液で洗浄し、同じ緩衝液に再懸濁して、GalNAc トランスフェラーゼ、GlcUA トランスフェラーゼ、および Gal トランスフェラーゼのアッセイに用いた。すなわち、培養液中で発現した融合タンパク質を、IgG-セファロー

スビーズに吸着させて内在性のグリコシルトランスフェラーゼ類を除去し、次いでこの酵素結合ビーズを、酵素源として用い、このビーズに結合させた融合タンパク質のグリコシルトランスフェラーゼ活性を、各種の受容体基質及び供与体基質を用いてアッセイした。

GalNAc トランスフェラーゼの受容体としては、コンドロイチンのポリマー (167  $\mu$ g)、 $\alpha$ -トロンプモジュリン (1 nmol)、または GlcUA  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl  $\beta$  1-0-Ser (1 nmol) を用いた。また、GlcUA トランスフェラーゼの受容体としては、コンドロイチンのポリマー (167  $\mu$ g)、または Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl (1 nmol) を用いた。Gal トランスフェラーゼの受容体としては、ヒツジ顎下腺アシアロムチン (300  $\mu$ g) または GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc (1 nmol) を用いた。GalNAc トランスフェラーゼのアッセイには、全容量 30  $\mu$ l 中に、再懸濁したビーズ 10  $\mu$ l、受容体基質、8.57  $\mu$ M UDP- $^3$ H]GalNAc ( $3.60 \times 10^5$  dpm)、50 mM MES 緩衝液、pH 6.5、10 mM MnCl<sub>2</sub>、および ATP のナトリウム塩 171  $\mu$ M を含有する混合物を用いた (J. Biochem. 117, 1083-1087 (1995))。

リンケージ部位の 4 糖の合成に必要な GlcUA トランスフェラーゼ I (GlcAT-I) のアッセイには、全容量 30  $\mu$ l 中に、再懸濁したビーズ 10  $\mu$ l、1 nmol Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl、14.3  $\mu$ M UDP- $^{14}$ C]GlcUA ( $1.46 \times 10^5$  dpm)、50 mM MES 緩衝液、pH 6.5、および 2 mM MnCl<sub>2</sub> を含有する混合物を用いた (FEBS lett. 459, 415-420 (1999))。GlcAT-II のアッセイには、全容量は 30  $\mu$ l 中に、再懸濁したビーズ 10  $\mu$ l、167  $\mu$ g のコンドロイチンのポリマー、14.3  $\mu$ M UDP- $^{14}$ C]GlcUA ( $1.46 \times 10^5$  dpm)、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.6、および 10 mM MnCl<sub>2</sub> を含



んでいた (Glycobiology 7, 905-911 (1997))。Gal トランスフェラーゼのアッセイには、全容量 30  $\mu$ l 中に、再懸濁したビーズ 10  $\mu$ l、受容体基質、60  $\mu$ M UDP-[ $^3$ H]Gal (5.30  $\times 10^5$  dpm)、50 mM MES 緩衝液、pH 6.5、10 mM MnCl<sub>2</sub>、および ATP のナトリウム塩 171  $\mu$ M を含有する混合物を用いた。反応混合物を 37° C で 1 時間インキュベートし、放射標識された生成物を、セファデックス G-25 (スーパーファイン) を充填したシリンジカラム、スーパーデックス ペプチド・カラム、または、Dowex 1-X8 (PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>型、100-400 メッシュ、Bio-Rad 社、東京) を含むパストールピペット・カラムを用いたゲル濾過によって、UDP-[ $^3$ H]GalNAc、UDP-[ $^{14}$ C]GlcUA、または、UDP-[ $^3$ H]Gal から分離した (J. Biochem. 117, 1083-1087 (1995); J. Biol. Chem. 273, 6615-6618 (1998); FEBS Lett. 459, 415-420 (1999); Glycobiology 7, 905-911 (1997); Glycobiology 7, 531-537 (1997))。回収した標識生成物を、液体シンチレーション分光法によって定量した。

なお、基質等の入手先は以下の通りであった。UDP-[U- $^{14}$ C]GlcUA (285.2 mCi/mmol)、UDP-[ $^3$ H]GalNAc (10 Ci/mmol)、および、UDP-[ $^3$ H]Gal (15 Ci/mmol) は、NEN Life Science Products 社から購入した。未標識の UDP-GlcUA、UDP-GalNAc および UDP-Gal は、Sigma から入手した。コンドロイチン (クジラ軟骨由来のコンドロイチン硫酸 A を化学的に脱硫酸化した誘導体) は、生化学工業株式会社 (東京) から購入した。均一に精製した、Ampullaria (淡水産アプルスネイル) 由来の肝臓  $\beta$ -グルクロニダーゼ (EC3.2.1.31) (Comp. Biochem. Physiol. 86B, 565-569 (1987)) は、東京臓器化学社 (東京) から提供された。Gal  $\beta$ 1-3Gal  $\beta$ 1-4Xyl は、Nancy B. Schwartz 博士 (シカゴ大学) から

恵与された。精製  $\alpha$ -トロノボモジュリン (Biochem. Biophys. Res. Commun. 171, 729-737 (1990)) は、第一製薬株式会社 (東京) から提供されたもので、リンケージ部分の 4 糖 (GlcUA  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl) (J. Biol. Chem. 273, 33728-33734 (1998)) を含む。N-アセチルコンドロシン (GlcUA  $\beta$  1-3GalNAc) および GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4GlcNAc は、K. Yoshida 博士 (生化学工業株式会社) から恵与された。化学的に合成されたリンケージ 4 糖-セリン (GlcUA  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl  $\beta$  1-0-Ser) (Liebigs Ann. 1239-1257 (1996)) は、T. Ogawa 博士 (理化学研究所、埼玉県) から恵与された。

ヒツジ顎下腺アシアロムチンは、Tettamanti と Pigman の方法 (Arch. Biochem. Biophys. 124, 45-50 (1968)) に従って調製したヒツジ顎下腺ムチンを、*Arthrobacter ureafaciens* 由来のシアリダーゼ (ナカライテスク社、京都) で処理して得た。Superdex (商標) ペプチド HR10/30 カラムは、Amersham Pharmacia Biotech 社 (ウプサラ、スウェーデン) から入手した。

結果を表 1 に示す。活性は、コンドロイチンのポリマーを受容体とし、UDP-GlcUA または UDP-GalNAc のいずれかを供与体として使用した場合に検出された。一方、他の受容体基質と、UDP-GlcUA、UDP-GalNAc または UDP-Gal のいずれかを供与体として使用した場合には活性は検出されなかった。そのような活性としては、コンドロイチン硫酸の生合成の開始に関わる GlcAT-I や、GalNAc トランスフェラーゼ I、コア 1 UDP-Gal:GalNAc  $\alpha$ -R  $\beta$  1,3-Gal トランスフェラーゼ、および UDP-Gal:GlcNAc  $\beta$ -R  $\beta$  1,4-Gal トランスフェラーゼ活性が含まれる。コントロールとして pEF-BOS をトランスフェクトしたサンプルのアフィニテ

イー精製物では、グリコシルトランスフェラーゼ活性は検出されなかった。これらの結果は、発現されたタンパク質が、コンドロイチンのポリマーに対して高い特異性を持つ GlcUA/GalNAc トランスフェラーゼであることを明確に示すものである。

なお、前記した通り、コンドロイチン（コンドロイチンのポリマー）には、非還元末端が GlcUA であるものと GalNAc であるものの双方が含まれ、GalNAc の転移は非還元末端が GlcUA であるコンドロイチンに対するものであり、GlcUA の転移は非還元末端が GalNAc であるコンドロイチンに対するものであるといえる。

表1 受容体特異性

受容体 (供与体)	活性 <sup>3)</sup> (pmol/ml培地 /時間)
コンドロイチン (UDP-GlcUA)	5.2
Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xyl (UDP-GlcUA)	ND
コンドロイチン (UDP-GalNAc)	1.4
GlcUA $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ 1-O-Ser (UDP-GalNAc)	ND
$\alpha$ -トロンボモジュリン <sup>1)</sup> (UDP-GalNAc)	ND
ヒツジ顎下腺アシアロムチン <sup>2)</sup> (UDP-Gal)	ND
GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (UDP-Gal)	ND

ND: 検出されず (<0.1 pmol/ml培地/時間)

1)  $\alpha$ -トロンボモジュリンは、四糖リンケージGlcUA $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xylを含む(J. Biol. Chem. 273, 33728-33734 (1998))。

2) ヒツジ顎下腺アシアロムチンは多数のGalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr残基を有する。

3) 値は、二回の独立した実験の平均値である。

#### (4) 酵素反応生成物の特定

コンドロイチンのポリマーを受容体とした、GalNAc トランスフェラ

ーゼ反応または GlcUA トランスフェラーゼ反応の生成物の単離を、0.25M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /7-プロパノールで平衡化したスーパーデックスペプチド・カラムを用いたゲル濾過によって行った。各酵素反応生成物を含む放射能ピークをプールして蒸発乾燥させた。この単離した GalNAc トランスフェラーゼ反応生成物（約 120  $\mu\text{g}$ ）を、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0 を含む 30  $\mu\text{l}$  の反応液中で、37° C で一晩、100 mIU の、*Arthrobacter aurescens*（アルトロバクター・オーレッセンス）由来のコンドロイチナーゼ AC-II（EC4.2.2.5）（生化学工業株式会社（東京））で消化して、その消化性を評価した。単離した GlcUA トランスフェラーゼ反応生成物（約 180  $\mu\text{g}$ ）は、100 mIU のコンドロイチナーゼ AC-II を含有する 30  $\mu\text{l}$  の 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH6.0 において、または、22 mIU の  $\beta$ -グルクロニダーゼを含有する 30  $\mu\text{l}$  の 0.05M クエン酸ナトリウム緩衝液、pH4.5 において、37° C で一晩消化した。各酵素の消化物を、前記と同じスーパーデックスペプチド・カラムを用いて分析した。

GlcUA トランスフェラーゼ反応生成物の分析結果を図 3 (a)に示す。標識された生成物は  $\beta$ -グルクロニダーゼまたはコンドロイチナーゼ AC-II によって完全に消化され、遊離の [ $^{14}\text{C}$ ]GlcUA または [ $^{14}\text{C}$ ]GlcUA  $\beta$  1-3GalNAc の位置にピークが見られた。この結果から、GlcUA 残基は、コンドロイチンのポリマーの非還元末端に存在する GalNAc に転移され、 $\beta$  1-3 結合を形成したことが示唆される。

GalNAc トランスフェラーゼ反応生成物の分析結果を図 3 (b)に示す。標識された生成物は、コンドロイチナーゼ AC-II によって完全に消化され、遊離の [ $^3\text{H}$ ]GalNAc の位置にピークが見られた。この結果から、

GalNAc 残基はコンドロイチンのポリマーの非還元末端に存在する GluUA に転移され、 $\beta$ -1-4 結合を形成したことが示唆される。

以上の結果をまとめると、この同定されたタンパク質は、GlcAT-II と GalNAcT-II の両方の活性を持つコンドロイチン合成酵素であることが明らかになった。

#### [実施例 2]

分析には、市販のヒト 12 レーン含有多数組織用ノーザンブロット (CLONETEC) 膜を用いた。各レーンに、1  $\mu$ g のポリアデニル化 RNA をアプライした。この膜に、放射標識され ( $>1 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ g)、ゲルで精製された 0.84 kb コンドロイチン合成酵素特異的断片 (KIAA0990 cDNA (GenBank アクセション番号 ; AB023207) のヌクレオチド 631-1469 に相当する) をプローブとして探索した。

この結果、調べた限りにおいて全てのヒト組織で ~5.0 kb の単一バンドが示された (図 4)。このコンドロイチン合成酵素遺伝子は、ヒト組織において広汎に存在するが、その発現の程度は組織によって異なっていた。注目すべきことに、この mRNA は胎盤で特に多く発現しており、脾臓、肺、および、末梢血白血球がそれに続いた。これらの所見は、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが、多くの細胞の表面と、ほとんど全ての組織の細胞外マトリックスに分布するという知見と一致する。

#### 産業上の利用の可能性

ヒトコンドロイチン合成酵素をコードする DNA を含むベクター、ヒトコンドロイチン合成酵素の製造方法、コンドロイチンの二糖繰返し単位を有する糖鎖の製造方法、ならびに、ヒトコンドロイチン合成酵素に

対するハイブリダイゼーション用プローブが提供される。

## 請 求 の 範 囲

1. 下記 (a) ~ (c) のいずれかのDNAを保持するベクターであって、前記 (b) 又は (c) のDNAが、下記 (イ) 及び (ロ) の触媒活性を有するタンパク質をコードしている前記ベクター (但し、配列番号2におけるアミノ酸番号1~802で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAを含むものを除く)。

(a) 配列番号2におけるアミノ酸番号47~802で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。

(b) 上記 (a) に記載のDNA若しくは当該DNAに相補的なDNA又はこれらのDNAの塩基配列の一部を有するDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

(c) 配列番号2におけるアミノ酸番号47~802で示されるアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするDNA。

(イ) コンドロイチンに、UDP-GalNAcからGalNAcを転移する。

(UDPはウリジン 5'-二リン酸を、GalNAcはN-アセチルガラクトサミン残基を示す。)

(ロ) コンドロイチンに、UDP-GlcUAからGlcUAを転移する。

(UDPはウリジン 5'-二リン酸を、GlcUAはグルクロン酸残基を示す。)

2. 前記 (a) のDNAが、配列番号1におけるヌクレオチド番号633~2900で示されるDNAである、請求項1に記載のベクター。

3. タンパク質が可溶性である、請求項1又は2に記載のベクター。

4. 発現ベクターである、請求項1~3のいずれか1項に記載のベク

ター。

5. 下記 (a) ~ (c) のいずれかの DNA を保持するベクターであって、前記 (b) 又は (c) の DNA が、下記 (イ) 及び (ロ) の触媒活性を有するタンパク質をコードしている前記ベクターによって宿主が形質転換された形質転換体。

(a) 配列番号 2 におけるアミノ酸番号 47 ~ 802 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする DNA。

(b) 上記 (a) に記載の DNA 若しくは当該 DNA に相補的な DNA 又はこれらの DNA の塩基配列の一部を有する DNA と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

(c) 配列番号 2 におけるアミノ酸番号 47 ~ 802 で示されるアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする DNA。

(イ) コンドロイチンに、UDP-GalNAc から GalNAc を転移する。

(UDP はウリジン 5'-二リン酸を、GalNAc は N-アセチルガラクトサミン残基を示す。)

(ロ) コンドロイチンに、UDP-GlcUA から GlcUA を転移する。

(UDP はウリジン 5'-二リン酸を、GlcUA はグルクロン酸残基を示す。)

6. 前記 (a) の DNA が、配列番号 1 におけるヌクレオチド番号 633 ~ 2900 で示される DNA である、請求項 5 に記載の形質転換体。

7. タンパク質が可溶性である、請求項 5 又は 6 に記載の形質転換体。

8. 請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の形質転換体を生育させ、そ



の生育物からコンドロイチン合成酵素を採取することを特徴とする、コンドロイチン合成酵素の製造方法。

9. 下記(A)又は(B)に示すアミノ酸配列をそのアミノ酸配列中に包含し、かつ下記(イ)及び(ロ)の触媒活性を有する酵素タンパク質を含有する、コンドロイチン合成用試薬。

(A) 配列番号2におけるアミノ酸番号47～802で示されるアミノ酸配列。(B) 上記(A)において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入又は転位したアミノ酸配列。

(イ) コンドロイチンに、UDP-GalNAcからGalNAcを転移する。

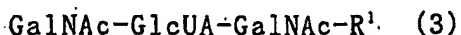
(UDPはウリジン 5'-二リン酸を、GalNAcはN-アセチルガラクトサミン残基を示す。)

(ロ) コンドロイチンに、UDP-GlcUAからGlcUAを転移する。

(UDPはウリジン 5'-二リン酸を、GlcUAはグルクロン酸残基を示す。)

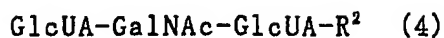
10. 酵素タンパク質が可溶性である請求項9に記載の試薬。

11. 請求項9又は10に記載の試薬を、GalNAc供与体及び下記一般式(1)で示される糖鎖に接触させる工程を少なくとも含む、下記一般式(3)で示される糖鎖の製造方法。



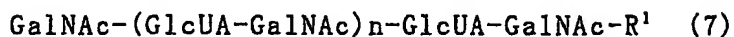
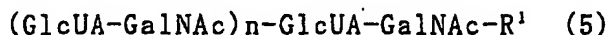
(各式中、GlcUA及びGalNAcは、いずれも前記と同義である。-はグリコシド結合を、R<sup>1</sup>は任意の基を示す。)

12. 請求項9又は10に記載の試薬を、GlcUA供与体及び下記一般式(2)で示される糖鎖に接触させる工程を少なくとも含む、下記一般式(4)で示される糖鎖の製造方法。



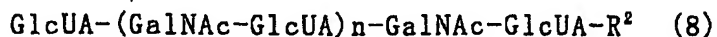
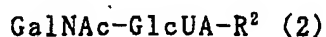
(各式中、GlcUA、GalNAc、及び - は、いずれも前記と同義である。R<sup>2</sup>は任意の基を示す。)

13. 請求項9又は10に記載の試薬を、GalNAc供与体及びGlcUA供与体、並びに下記一般式(1)で示される糖鎖に接触させる工程を少なくとも含む、下記一般式(5)及び(7)から選ばれる糖鎖の製造方法。



(各式中、nは1以上の整数を示し、GlcUA、GalNAc、及び - は、いずれも前記と同義である。またR<sup>1</sup>は任意の基を示す。)

14. 請求項9又は10に記載の試薬を、GalNAc供与体及びGlcUA供与体、並びに下記一般式(2)で示される糖鎖に接触させる工程を少なくとも含む、下記一般式(6)及び(8)から選ばれる糖鎖の製造方法。



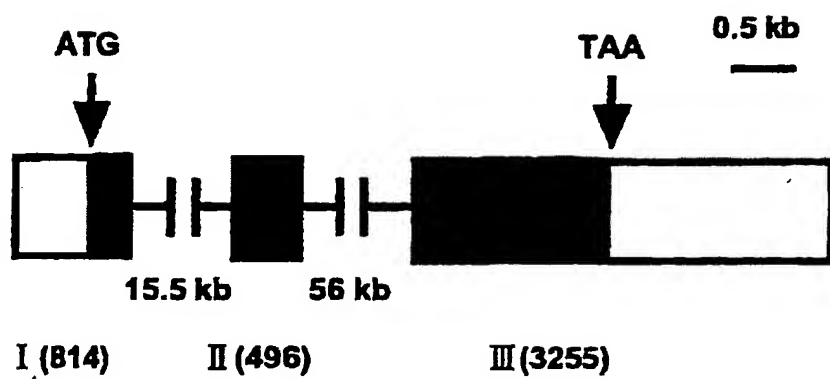
(各式中、nは1以上の整数を示し、GlcUA、GalNAc、及び - は、いずれも前記と同義である。またR<sup>2</sup>はいずれも任意の基を示す。)

15. 配列番号1におけるヌクレオチド番号495～2900で示される塩基配列又はその一部に相補的な配列を有するハイブリダイゼーション用プローブ。

図 1

Human	1	MAARRAWLSVLLGLVIGFVIA	SRVLVPRASELKRACPRRRASRSGCRSGQAASQAGGARGDARGAQLWPPGSDPGGPRDRNFLEVGVMTAQKYLQ	99
C.elegans	1	MRVSTCRMPVSRATVTILLGLIFGFSITYLTATKSLTNPIICGPEQOIGGFYLDVIS	QRADADVETRSQSLPGHRR	79
Drosophila	1		MTAKSFLE	8
Human	100	TRAVAAVRIWSTKIPGKVQFSSGSDTSVP	IEWPVRGVDDSSVPQKNSFMKMYMDHYLDKVEHMRADDDVYIKGDRLENFLRNSSEPLETGGT	199
C.elegans	80	GLILVAIMTAARVYDTRAYNELESVH	EDMELIRIKGVDDTYPPQKKSFAWKWLAENMADEYDFELRADDDILAIRGEELALFLRSVDSSKAHLIGQA	176
Drosophila	9	GRARAVDTWCKNEVPGRMAFFSEGS	YSDDLFWGCKNVDDRVPPQKKSFMFYMYEHYIDRFEMFIRADDDVYMEPKLERFLRSIDSSKPKQFIGQA	107
Human	200	GLGTTFEMGKIALPEGENFCWGGPGVIMSRREVIRRMVPHIGKCLIREMYTTHEDVEVGRCVRRFAGVQC	VSVEYMQQLFVENYEONKKGIVRDLHNSKIHQ	299
C.elegans	177	GLGNSAEYGLIALGSTDNYCNGGPGIVMSRDTLLKVSPHLESCLQMLTSHEDVELGRCIRKHVGVACTNYEMQKLFHNMQSAIKESWAKNMK	ELKD	274
Drosophila	108	GKGNSEFGLLSIEFDENFCWGGPGVILSSETLRRVAPHIPSCIKNLYSTHEDVEVGRCVOKFAGIPCTNYEMQYILRHNS	SSGRNAVTKLKRKEIHN	206
Human	300	AITLHNMKNPVOYRLHSYMLSRKISELHRTIOIHRREIVMSKYSNT		357
C.elegans	275	AITLHPKIDPAVRKVLHNRREIKLREARAKRSLSSELSTAKAQTLAR		323
Drosophila	207	AITLHPKIDPAVRKVLHNRREIKLREARAKRSLSSELSTAKAQTLAR		306
Human	358	IPPSWRFQOROREILLEFEELTG	KYVTSVVDGQPPRRGMDSAQTEALDEIVQVMEMINANAKTGRGRLIDEKEIOGVGRVNVNPMYGAEYTI	448
C.elegans	324	MTENRTNDLTPMEYNNKTI	FOCDRVNCRHTVPLSLSTEMADTLTQLDFEFNARQGRVLOQFOSLOQVMRVEPTKGVYDVV	408
Drosophila	307	YKDKIQRIYSPELNKFVEASTDLDLSFLA	RSIVSSANPKQKIDSAMEGEGEDAITTEVMENINNYSRQGRVTEFERELIYGYHLDALHGDMDI	403
Human	449	LDLILLYKNHKG	KKMTVPVRHAYLQOTFSKIOFVEHELDLQELAKRINQESGSLSLNSLKKLVFPQJPGSKSEHKEPKDKKINILLIPISGRFDMF	547
C.elegans	409	LDMLLWFKKERPPNRTTISVRHAYVQITG		478
Drosophila	404	LDLILLYKNHKG	KKMTVPVRHAYVQITG	496
Human	548	VREMGNFETSLIP	NONVKEVWLLFNSQSNPDKAKQVEIMTVDYRTKYPKADQILPVSGPESRALALEVGS	643
C.elegans	479	AREACHLKSICARGGDDLAVSTIVYSSDEMEMENRETIEMIRASHPVTVIEMGDVS	ESRGVALMRGAETLPAVALFFTDVDMILFTCDALKR	572
Drosophila	497	ERELRTYERVVRG	EQHCDLAVIIFGSPD	592
Human	644	CRANVILGOQINFFPIIESQYDPKIVYSGKVPESDN	HEAFTOKTGFWRNYEFGTCTCYRGGIVR	731
C.elegans	573	IKSNILLNACINFPVIFSEFSESWSENDKLAD	AHYGRGQYFRHFQYGLAAMYRABLMID	660
Drosophila	593	VRMHORGQVNLPIVESQYDPQRSGDAGSEDEGETPRIDDEGYFQFQFQICAIYKRSILDEEDINGEKKDITENGLEDVKKFLEALVRVGTORGFL		692
Human	732	IKTFRSQEIVVHVHVPVFCDPNLDKPKIKWICLSKASTYSGTQOIAEMWLEKNDPSSKSNNGSVRTA		802
C.elegans	661	RLVTRVPEPGIAVHYPIPCDENMPTAKDCHCSKAASIASIDTIVEQIAQYT		715
Drosophila	693	ANTAELAMDYNEAAEQWRRISVFRAPDPTAVHYIDGSLVQLDAPQINWCLGKANSLSGSTRLMEQLFHSSPENVOFAADENRQKQOQOQOQOQAR		788

図 2



3 / 4

図 3 (a)

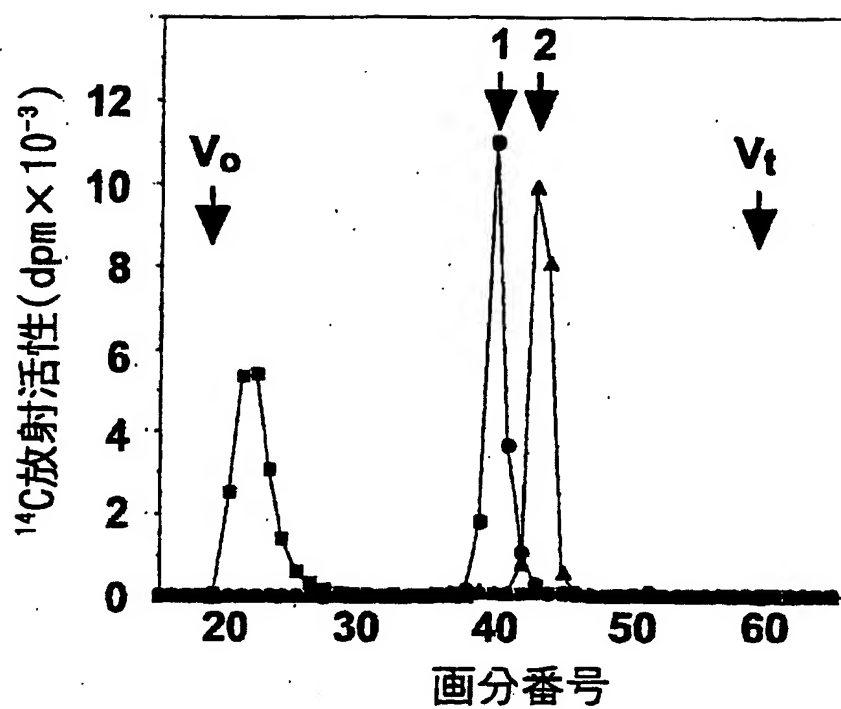


図 3 (b)

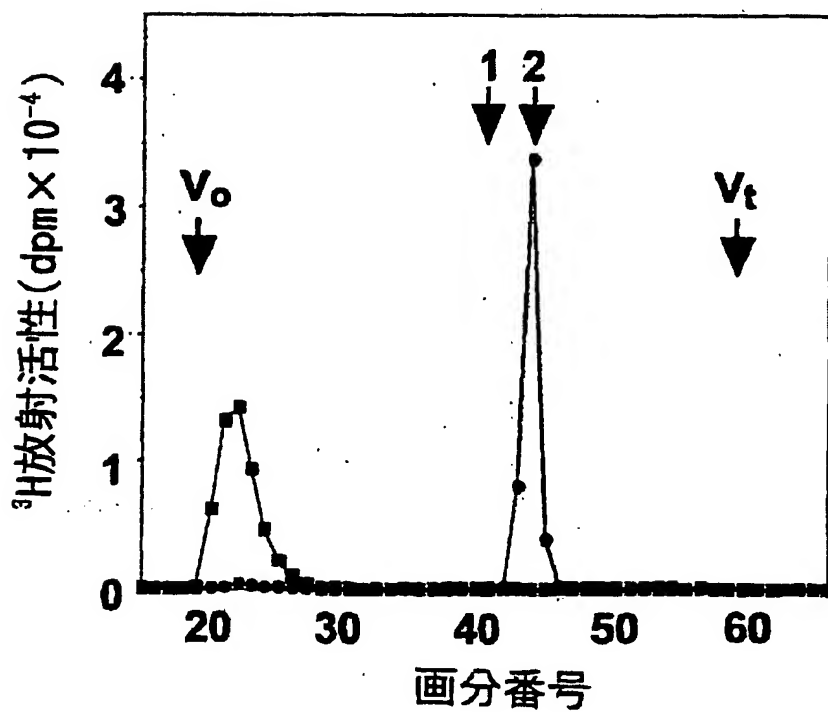
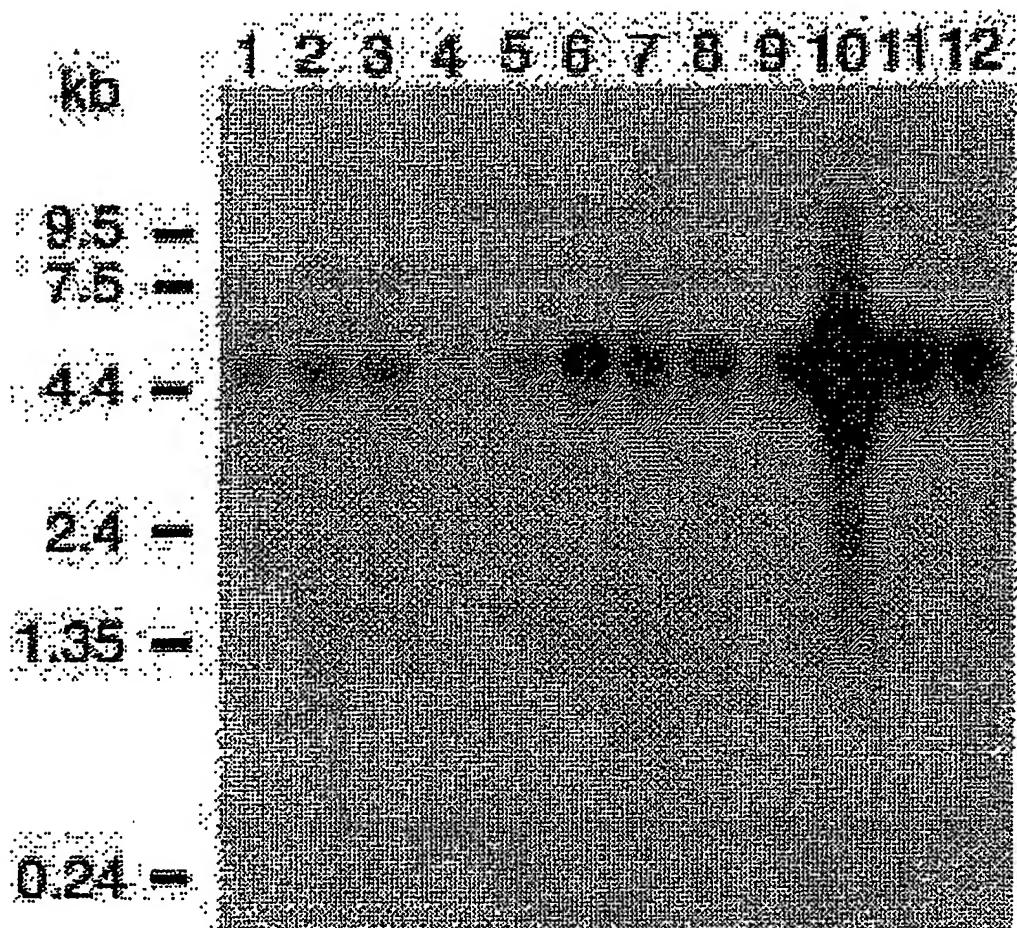


図 4



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; The New Industry Research Organization

&lt;120&gt; コンドロイチン合成酵素

Chondroitin synthetic enzyme

&lt;130&gt; TLO 0210

&lt;150&gt; JP 2001-234112

&lt;151&gt; 2001-8-1

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn version 3.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 4565

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (495)..(2900)

&lt;400&gt; 1

ggcgagctaa gccggaggat gtgcagctgc ggcggcggcg ccggctacga agaggacggg 60

gacaggcgcc gtgcgaaccg agcccagcca gccggaggac gcgggcaggg cgggacggga 120

gcccggactc gtctgccgcc gccgtcgtcg ccgtcgtgcc ggcccccggt ccccgcgcg 180

gagcgggagg agccgccgcc acctcgcgcc cgagccgcc ctagcgcgcg ccgggcatgg 240

tcccctctta aaggcgagg ccgcggcgcc gggggcgggc gtgcggaaca aagcgccggc 300

gcggggcctg cgggcggctc gggggccgcg atgggcgcgg cgggcccgcg gcggcggcgg 360

cgctgcccgg gccgggcctc gcggcgctag ggccggctgg cctccgcggg cgggggcagc 420

gggctgaggg cgcgcggggc ctgcggcgcc ggccggcgcg gcggcgcgcc cccggcgggc 480

ggagcggcgc gggc atg gcc gcg cgc ggc cgg cgc gcc tgg ctc agc gtg 530

Met Ala Ala Arg Gly Arg Arg Ala Trp Leu Ser Val

1

5

10

ctg ctc ggg ctc gtc ctg ggc ttc gtg ctg gcc tcg cgg ctc gtc ctg 578

Leu Leu Gly Leu Val Leu Gly Phe Val Leu Ala Ser Arg Leu Val Leu  
 15 20 25  
 ccc cgg gct tcc gag ctg aag cga gcg ggc cca cgg cgc gcg gcc agc 626  
 Pro Arg Ala Ser Glu Leu Lys Arg Ala Gly Pro Arg Arg Arg Ala Ser  
 30 35 40  
 ccc gag ggc tgc cgg tcc ggg cag gcg gcg gct tcc cag gcc ggc ggc 674  
 Pro Glu Gly Cys Arg Ser Gly Gln Ala Ala Ala Ser Gln Ala Gly Gly  
 45 50 55 60  
 gcg cgc ggc gat gcg cgc ggg gcg cag ctc tgg ccg ccc ggc tcg gac 722  
 Ala Arg Gly Asp Ala Arg Gly Ala Gln Leu Trp Pro Pro Gly Ser Asp  
 65 70 75  
 cca gat ggc ggc ccg cgc gac agg aac ttt ctc ttc gtg gga gtc atg 770  
 Pro Asp Gly Gly Pro Arg Asp Arg Asn Phe Leu Phe Val Gly Val Met  
 80 85 90  
 acc gcc cag aaa tac ctg cag act cgg gcc gtg gcc gcc tac aga aca 818  
 Thr Ala Gln Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Ala Val Ala Ala Tyr Arg Thr  
 95 100 105  
 tgg tcc aag aca att cct ggg aaa gtt cag ttc ttc tca agt gag ggt 866  
 Trp Ser Lys Thr Ile Pro Gly Lys Val Gln Phe Phe Ser Ser Glu Gly  
 110 115 120  
 tct gac aca tct gta cca att cca gta gtg cca cta cgg ggt gtg gac 914  
 Ser Asp Thr Ser Val Pro Ile Pro Val Val Pro Leu Arg Gly Val Asp  
 125 130 135 140  
 gac tcc tac ccg ccc cag aag aag tcc ttc atg atg ctc aag tac atg 962  
 Asp Ser Tyr Pro Pro Gln Lys Lys Ser Phe Met Met Leu Lys Tyr Met  
 145 150 155  
 cac gac cac tac ttg gac aag tat gaa tgg ttt atg aga gca gat gat 1010  
 His Asp His Tyr Leu Asp Lys Tyr Glu Trp Phe Met Arg Ala Asp Asp  
 160 165 170



gac gtg tac atc aaa gga gac cgt ctg gag aac ttc ctg agg agt ttg 1058  
 Asp Val Tyr Ile Lys Gly Asp Arg Leu Glu Asn Phe Leu Arg Ser Leu  
 175 180 185  
 aac agc agc gag ccc ctc ttt ctt ggg cag aca ggc ctg ggc acc acg 1106  
 Asn Ser Ser Glu Pro Leu Phe Leu Gly Gln Thr Gly Leu Gly Thr Thr  
 190 195 200  
 gaa gaa atg gga aaa ctg gcc ctg gag cct ggt gag aac ttc tgc atg 1154  
 Glu Glu Met Gly Lys Leu Ala Leu Glu Pro Gly Glu Asn Phe Cys Met  
 205 210 215 220  
 ggg ggg cct ggc gtg atc atg agc cgg gag gtg ctt cgg aga atg gtg 1202  
 Gly Gly Pro Gly Val Ile Met Ser Arg Glu Val Leu Arg Arg Met Val  
 225 230 235  
 ccg cac att ggc aag tgt ctc cgg gag atg tac acc acc cat gag gac 1250  
 Pro His Ile Gly Lys Cys Leu Arg Glu Met Tyr Thr Thr His Glu Asp  
 240 245 250  
 gtg gag gtg gga agg tgt gtc cgg agg ttt gca ggg gtg cag tgt gtc 1298  
 Val Glu Val Gly Arg Cys Val Arg Arg Phe Ala Gly Val Gln Cys Val  
 255 260 265  
 tgg tct tat gag atg cag cag ctt ttt tat gag aat tac gag cag aac 1346  
 Trp Ser Tyr Glu Met Gln Gln Leu Phe Tyr Glu Asn Tyr Glu Gln Asn  
 270 275 280  
 aaa aag ggg tac att aga gat ctc cat aac agt aaa att cac caa gct 1394  
 Lys Lys Gly Tyr Ile Arg Asp Leu His Asn Ser Lys Ile His Gln Ala  
 285 290 295 300  
 atc aca tta cac ccc aac aaa aac cca ccc tac cag tac agg ctc cac 1442  
 Ile Thr Leu His Pro Asn Lys Asn Pro Pro Tyr Gln Tyr Arg Leu His  
 305 310 315  
 agc tac atg ctg agc cgc aag ata tcc gag ctc cgc cat cgc aca ata 1490  
 Ser Tyr Met Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu Leu Arg His Arg Thr Ile

320	325	330	
cag ctg cac cgc gaa att gtc ctg atg agc aaa tac agc aac aca gaa			1538
Gln Leu His Arg Glu Ile Val Leu Met Ser Lys Tyr Ser Asn Thr Glu			
335	340	345	
att cat aaa gag gac ctc cag ctg gga atc cct ccc tcc ttc atg agg			1586
Ile His Lys Glu Asp Leu Gln Leu Gly Ile Pro Pro Ser Phe Met Arg			
350	355	360	
ttt cag ccc cgc cag cga gag gag att ctg gaa tgg gag ttt ctg act			1634
Phe Gln Pro Arg Gln Arg Glu Glu Ile Leu Glu Trp Glu Phe Leu Thr			
365	370	375	380
gga aaa tac ttg tat tcg gca gtt gac ggc cag ccc cct cga aga gga			1682
Gly Lys Tyr Leu Tyr Ser Ala Val Asp Gly Gln Pro Pro Arg Arg Gly			
385	390	395	
atg gac tcc gcc cag agg gaa gcc ttg gac gac att gtc atg cag gtc			1730
Met Asp Ser Ala Gln Arg Glu Ala Leu Asp Asp Ile Val Met Gln Val			
400	405	410	
atg gag atg atc aat gcc aac gcc aag acc aga ggg cgc atc att gac			1778
Met Glu Met Ile Asn Ala Asn Ala Lys Thr Arg Gly Arg Ile Ile Asp			
415	420	425	
ttc aaa gag atc cag tac ggc tac cgc cgg gtg aac ccc atg tat ggg			1826
Phe Lys Glu Ile Gln Tyr Gly Tyr Arg Arg Val Asn Pro Met Tyr Gly			
430	435	440	
gct gag tac atc ctg gac ctg ctg ctt ctg tac aaa aag cac aaa ggg			1874
Ala Glu Tyr Ile Leu Asp Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Lys His Lys Gly			
445	450	455	460
aag aaa atg acg gtc cct gtg agg agg cac gcg tat tta cag cag act			1922
Lys Lys Met Thr Val Pro Val Arg Arg His Ala Tyr Leu Gln Gln Thr			
465	470	475	
ttc agc aaa atc cag ttt gtg gag cat gag gag ctg gat gca caa gag			1970

Phe Ser Lys Ile Gln Phe Val Glu His Glu Glu Leu Asp Ala Gln Glu  
 480 485 490  
 ttg gcc aag aga atc aat cag gaa tct gga tcc ttg tcc ttt ctc tca 2018  
 Leu Ala Lys Arg Ile Asn Gln Glu Ser Gly Ser Leu Ser Phe Leu Ser  
 495 500 505  
 aac tcc ctg aag aag ctc gtc ccc ttt cag ctc cct ggg tcg aag agt 2066  
 Asn Ser Leu Lys Lys Leu Val Pro Phe Gln Leu Pro Gly Ser Lys Ser  
 510 515 520  
 gag cac aaa gaa ccc aaa gat aaa aag ata aac ata ctg att cct ttg 2114  
 Glu His Lys Glu Pro Lys Asp Lys Lys Ile Asn Ile Leu Ile Pro Leu  
 525 530 535 540  
 tct ggg cgt ttc gac atg ttt gtg aga ttt atg gga aac ttt gag aag 2162  
 Ser Gly Arg Phe Asp Met Phe Val Arg Phe Met Gly Asn Phe Glu Lys  
 545 550 555  
 acg tgt ctt atc ccc aat cag aac gtc aag ctc gtg gtt ctg ctt ttc 2210  
 Thr Cys Leu Ile Pro Asn Gln Asn Val Lys Leu Val Val Leu Leu Phe  
 560 565 570  
 aat tct gac tcc aac cct gac aag gcc aaa caa gtt gaa ctg atg aca 2258  
 Asn Ser Asp Ser Asn Pro Asp Lys Ala Lys Gln Val Glu Leu Met Thr  
 575 580 585  
 gat tac cgc att aag tac cct aaa gcc gac atg cag att ttg cct gtg 2306  
 Asp Tyr Arg Ile Lys Tyr Pro Lys Ala Asp Met Gln Ile Leu Pro Val  
 590 595 600  
 tct gga gag ttt tca aga gcc ctg gcc ctg gaa gta gga tcc tcc cag 2354  
 Ser Gly Glu Phe Ser Arg Ala Leu Ala Leu Glu Val Gly Ser Ser Gln  
 605 610 615 620  
 ttt aac aat gaa tct ttg ctc ttc ttc tgc gac gtc gac ctc gtc ttt 2402  
 Phe Asn Asn Glu Ser Leu Leu Phe Phe Cys Asp Val Asp Leu Val Phe  
 625 630 635

act aca gaa ttc ctt cag cga tgt cga gca aat aca gtt ctg ggc caa	2450
Thr Thr Glu Phe Leu Gln Arg Cys Arg Ala Asn Thr Val Leu Gly Gln	
640 645 650	
caa ata tat ttt cca atc atc ttc agc cag tat gac cca aag att gtt	2498
Gln Ile Tyr Phe Pro Ile Ile Phe Ser Gln Tyr Asp Pro Lys Ile Val	
655 660 665	
tat agt ggg aaa gtt ccc agt gac aac cat ttt gcc ttt act cag aaa	2546
Tyr Ser Gly Lys Val Pro Ser Asp Asn His Phe Ala Phe Thr Gln Lys	
670 675 680	
act ggc ttc tgg aga aac tat ggg ttt ggc atc acg tgt att tat aag	2594
Thr Gly Phe Trp Arg Asn Tyr Gly Phe Gly Ile Thr Cys Ile Tyr Lys	
685 690 695 700	
gga gat ctt gtc cga gtg ggt ggc ttt gat gtt tcc atc caa ggc tgg	2642
Gly Asp Leu Val Arg Val Gly Gly Phe Asp Val Ser Ile Gln Gly Trp	
705 710 715	
ggg ctg gag gat gtg gac ctt ttc aac aag gtt gtc cag gca ggt ttg	2690
Gly Leu Glu Asp Val Asp Leu Phe Asn Lys Val Val Gln Ala Gly Leu	
720 725 730	
aag acg ttt agg agc cag gaa gta gga gta gtc cac gtc cac cat cct	2738
Lys Thr Phe Arg Ser Gln Glu Val Gly Val Val His Val His His Pro	
735 740 745	
gtc ttt tgt gat ccc aat ctt gac ccc aaa cag tac aaa atg tgc ttg	2786
Val Phe Cys Asp Pro Asn Leu Asp Pro Lys Gln Tyr Lys Met Cys Leu	
750 755 760	
ggg tcc aaa gca tcg acc tat ggg tcc aca cag cag ctg gct gag atg	2834
Gly Ser Lys Ala Ser Thr Tyr Gly Ser Thr Gln Gln Leu Ala Glu Met	
765 770 775 780	
tgg ctg gaa aaa aat gat cca agt tac agt aaa agc agc aat aat aat	2882
Trp Leu Glu Lys Asn Asp Pro Ser Tyr Ser Lys Ser Ser Asn Asn Asn	

785	790	795	
ggc tca gtg agg aca gcc taatgtccag ctttgctgga aaagacgttt			2930
Gly Ser Val Arg Thr Ala			
800			
ttaattatct aatttatattt tcaaaaattt tttglatgat cagtttttga agtccgtata			2990
caaggatata ttttacaagt ggttttctta cataggactc ctttaagatt gagctttctg			3050
aacaagaagg tgatcagtgt ttgcctttga acacatcttc ttgctgaaca ttatgtagca			3110
gacctgctta actttgactt gaaatgtacc tgatgaacaa aactttttta aaaaaatgtt			3170
ttcttttgag accctttgct ccagtcctat ggagaaaaac gtgaacattc ctgcaaagta			3230
ttattgtaac aaaacactgt aactctggta aatgttcigt tigtattgtt aacattccac			3290
agattctacc ttttggtgtt tgtttttttt tttttacaat tgttttaaag ccatttcatg			3350
ttccagtgtt aagataagga aatgtgataa tagctgtttc atcattgtct tcaggagagc			3410
ttccagagt tgatcatttc cctcatggt actctgctca gcatggccac gtaggttttt			3470
tgtttgtttt gttttgttct ttttttgaga cggagtctca ctctgttacc caggctggaa			3530
tgcagtggcg caatcttggc tcactttaac ctccacttcc ctggttcaag caattcccct			3590
gcctttgcct cccgagtagc tgggattaca ggcacacacc accacgcca gctagttttt			3650
ttgtattttt agtagagacg gggtttcacc atgcaagccc agctggccac gtaggtttta			3710
aagcaagggg cgtgaagaag gcacagttag gtatgtggct gttctcgtgg tagttcattc			3770
ggcetaaata gacctggcat taaatttcaa gaaggatttg gcattttctc ttcttgacct			3830
ttctctttta agggtaaaat attaatgttt agaattgacaa agatgaatta ttacaataaa			3890
tctgatgtac acagactgaa acacacacac atacacccta atcaaacgt tggggaaaaa			3950
tgtatttggg tttgttctt tcatcctgtc tgtgttatgt ggggtggagat ggttttcatt			4010
ctttcattac tgttttggtt tatcctttgt atctgaaata cctttaattt atttaatatc			4070
tgttttcag agctctgcca tttcttgagt accgttagt tagtattatt tatgtgtatc			4130
gggagtgtgt ttagtctgtt ttatttgag taaaccgatc tccaaagatt tccttttgga			4190
aacgcttttt cccctcctta atttttatat tccttactgt ttactaaat attaatgtt			4250
ctttgacaat tttggtgctc atgtgttttg gggacaaaag tgaaatgaat ctgtcattat			4310
accagaaagt taaattctca gatcaaatgt gccttaataa atttgtttct atttagattt			4370
caaacagtga tagacttgcc attttaatac acgtcattgg agggctgcgt atttgtaaat			4430

agcctgatgc tcatttggaa aaataaacca gtgaacaata tttttctatt gtacttttca 4490  
 gaaccatttt gtctcattat tcctgtttta gctgaagaat tgtattacat ttggagagta 4550  
 aaaaacttaa acacg 4565

<210> 2

<211> 802

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ala Arg Gly Arg Arg Ala Trp Leu Ser Val Leu Leu Gly Leu

1 5 10 15

Val Leu Gly Phe Val Leu Ala Ser Arg Leu Val Leu Pro Arg Ala Ser

20 25 30

Glu Leu Lys Arg Ala Gly Pro Arg Arg Arg Ala Ser Pro Glu Gly Cys

35 40 45

Arg Ser Gly Gln Ala Ala Ala Ser Gln Ala Gly Gly Ala Arg Gly Asp

50 55 60

Ala Arg Gly Ala Gln Leu Trp Pro Pro Gly Ser Asp Pro Asp Gly Gly

65 70 75 80

Pro Arg Asp Arg Asn Phe Leu Phe Val Gly Val Met Thr Ala Gln Lys

85 90 95

Tyr Leu Gln Thr Arg Ala Val Ala Ala Tyr Arg Thr Trp Ser Lys Thr

100 105 110

Ile Pro Gly Lys Val Gln Phe Phe Ser Ser Glu Gly Ser Asp Thr Ser

115 120 125

Val Pro Ile Pro Val Val Pro Leu Arg Gly Val Asp Asp Ser Tyr Pro

130 135 140

Pro Gln Lys Lys Ser Phe Met Met Leu Lys Tyr Met His Asp His Tyr

145 150 155 160

Leu Asp Lys Tyr Glu Trp Phe Met Arg Ala Asp Asp Asp Val Tyr Ile

165	170	175
Lys Gly Asp Arg Leu Glu Asn Phe Leu Arg Ser Leu Asn Ser Ser Glu		
180	185	190
Pro Leu Phe Leu Gly Gln Thr Gly Leu Gly Thr Thr Glu Glu Met Gly		
195	200	205
Lys Leu Ala Leu Glu Pro Gly Glu Asn Phe Cys Met Gly Gly Pro Gly		
210	215	220
Val Ile Met Ser Arg Glu Val Leu Arg Arg Met Val Pro His Ile Gly		
225	230	235
Lys Cys Leu Arg Glu Met Tyr Thr Thr His Glu Asp Val Glu Val Gly		240
245	250	255
Arg Cys Val Arg Arg Phe Ala Gly Val Gln Cys Val Trp Ser Tyr Glu		
260	265	270
Met Gln Gln Leu Phe Tyr Glu Asn Tyr Glu Gln Asn Lys Lys Gly Tyr		
275	280	285
Ile Arg Asp Leu His Asn Ser Lys Ile His Gln Ala Ile Thr Leu His		
290	295	300
Pro Asn Lys Asn Pro Pro Tyr Gln Tyr Arg Leu His Ser Tyr Met Leu		
305	310	315
Ser Arg Lys Ile Ser Glu Leu Arg His Arg Thr Ile Gln Leu His Arg		
325	330	335
Glu Ile Val Leu Met Ser Lys Tyr Ser Asn Thr Glu Ile His Lys Glu		
340	345	350
Asp Leu Gln Leu Gly Ile Pro Pro Ser Phe Met Arg Phe Gln Pro Arg		
355	360	365
Gln Arg Glu Glu Ile Leu Glu Trp Glu Phe Leu Thr Gly Lys Tyr Leu		
370	375	380
Tyr Ser Ala Val Asp Gly Gln Pro Pro Arg Arg Gly Met Asp Ser Ala		
385	390	395
		400

Gln Arg Glu Ala Leu Asp Asp Ile Val Met Gln Val Met Glu Met Ile

405

410

415

Asn Ala Asn Ala Lys Thr Arg Gly Arg Ile Ile Asp Phe Lys Glu Ile

420

425

430

Gln Tyr Gly Tyr Arg Arg Val Asn Pro Met Tyr Gly Ala Glu Tyr Ile

435

440

445

Leu Asp Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Lys His Lys Gly Lys Lys Met Thr

450

455

460

Val Pro Val Arg Arg His Ala Tyr Leu Gln Gln Thr Phe Ser Lys Ile

465

470

475

480

Gln Phe Val Glu His Glu Glu Leu Asp Ala Gln Glu Leu Ala Lys Arg

485

490

495

Ile Asn Gln Glu Ser Gly Ser Leu Ser Phe Leu Ser Asn Ser Leu Lys

500

505

510

Lys Leu Val Pro Phe Gln Leu Pro Gly Ser Lys Ser Glu His Lys Glu

515

520

525

Pro Lys Asp Lys Lys Ile Asn Ile Leu Ile Pro Leu Ser Gly Arg Phe

530

535

540

Asp Met Phe Val Arg Phe Met Gly Asn Phe Glu Lys Thr Cys Leu Ile

545

550

555

560

Pro Asn Gln Asn Val Lys Leu Val Val Leu Leu Phe Asn Ser Asp Ser

565

570

575

Asn Pro Asp Lys Ala Lys Gln Val Glu Leu Met Thr Asp Tyr Arg Ile

580

585

590

Lys Tyr Pro Lys Ala Asp Met Gln Ile Leu Pro Val Ser Gly Glu Phe

595

600

605

Ser Arg Ala Leu Ala Leu Glu Val Gly Ser Ser Gln Phe Asn Asn Glu

610

615

620

Ser Leu Leu Phe Phe Cys Asp Val Asp Leu Val Phe Thr Thr Glu Phe



625                      630                      635                      640  
 Leu Gln Arg Cys Arg Ala Asn Thr Val Leu Gly Gln Gln Ile Tyr Phe  
                     645                      650                      655  
 Pro Ile Ile Phe Ser Gln Tyr Asp Pro Lys Ile Val Tyr Ser Gly Lys  
                     660                      665                      670  
 Val Pro Ser Asp Asn His Phe Ala Phe Thr Gln Lys Thr Gly Phe Trp  
                     675                      680                      685  
 Arg Asn Tyr Gly Phe Gly Ile Thr Cys Ile Tyr Lys Gly Asp Leu Val  
                     690                      695                      700  
 Arg Val Gly Gly Phe Asp Val Ser Ile Gln Gly Trp Gly Leu Glu Asp  
 705                      710                      715                      720  
 Val Asp Leu Phe Asn Lys Val Val Gln Ala Gly Leu Lys Thr Phe Arg  
                     725                      730                      735  
 Ser Gln Glu Val Gly Val Val His Val His His Pro Val Phe Cys Asp  
                     740                      745                      750  
 Pro Asn Leu Asp Pro Lys Gln Tyr Lys Met Cys Leu Gly Ser Lys Ala  
                     755                      760                      765  
 Ser Thr Tyr Gly Ser Thr Gln Gln Leu Ala Glu Met Trp Leu Glu Lys  
                     770                      775                      780  
 Asn Asp Pro Ser Tyr Ser Lys Ser Ser Asn Asn Asn Gly Ser Val Arg  
 785                      790                      795                      800  
 Thr Ala

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<223> primer

<400> 3

ccctcgaggg gctgccggtc cgggc

25

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<223> primer

<400> 4

ccctcgagca atcttaaagg agtcctatgt a

31

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07859

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N9/10, C12N5/10, C12Q1/68, C12P19/18.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N9/10, C12N5/10, C12Q1/68, C12P19/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/58473 A2 (Curagen Corp.), 05 October, 2000 (05.10.00), Sequence Nos. 529 to 530; Claims & AU 200037745 A & EP 1165784 A2	1-8, 14
X	WO 00/12708 A2 (Genentech Inc.), 09 March, 2000 (09.03.00), Figs. 143 to 144; Claims & AU 9955908 A & US 6144037 A & EP 1144629 A2 & MX 2001002238 A1 & ZA 200101180 A & JP 2002-526075 A	1-8, 14
X	WO 00/78961 A1 (Genentech Inc.), 28 December, 2000 (28.12.00), Figs. 143 to 144; Claims & AU 200028837 A	1-8, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 31 October, 2002 (31.10.02)	Date of mailing of the international search report 05 November, 2002 (05.11.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07859

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 01/68848 A2 (Genentech Inc.), 20 September, 2001 (20.09.01), Figs. 311 to 312; Claims & AU 200168028 A & US 2002/0090681 A1	1-8, 14
<u>P, X</u> P, A	WO 01/87321 A2 (Euro Molecular Biology Lab.), 22 November, 2001 (22.11.01), Full text & AU 200162589 A	<u>14</u> 1-13
A	DEANGELIS, PL. et al., "Identification and Molecular Cloning of a Chondroitin Synthase from <i>Pasteurella</i> <i>multocida</i> Type F", J.Biol.Chem., (2000), Vol.275, No.31, p.24124-24129	1-14
A	SUGUMARAN, G. et al., "Biosynthesis of Chondroitin Sulfate", J.Biol.Chem., (1997), Vol.272, No.22, p.14399-14403	1-14
A	TSUCHIDA, K. et al., "Purification and characte -rization of fetal bovine serum $\beta$ -N-acetyl-D-galac -tosaminyltransferase and $\beta$ -D-glucuronyltransfe -rase involved in chondroitin sulfate biosynthesis Eur.J.Biochem., (1999), Vol.264, p.461-467	1-14

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/09, C12N 9/10, C12N 5/10, C12Q 1/68, C12P 19/18

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/09, C12N 9/10, C12N 5/10, C12Q 1/68, C12P 19/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/58473 A2 (CURAGEN CORP) 2000. 10. 05, 配列番号529-530, 特許請求の範囲 & AU 200037745 A & EP 1165784 A2	1-8, 14
X	WO 00/12708 A2 (GENENTECH INC) 2000. 03. 09, 第143-144図, 特許請求の範囲 & AU 9955908 A & US 6144037 A & EP 1144629 A2 & MX 2001002238 A1	1-8, 14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 10. 02

国際調査報告の発送日

05.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹



4N

3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	& ZA 200101180 A & JP 2002-526075 A	
X	WO 00/78961 A1 (GENENTECH INC) 2000. 12. 28, 第143-144図, 特許請求の範囲 & AU 200028837 A	1-8, 14
P, X	WO 01/68848 A2 (GENENTECH INC) 2001. 09. 20, 第311-312図, 特許請求の範囲 & AU 200168028 A & US 2002/0090681 A1	1-8, 14
<u>P, X</u> P, A	WO 01/87321 A2 (EURO MOLECULAR BIOLOGY LAB) 2001. 11. 22, 全文 & AU 200162589 A	<u>14</u> 1-13
A	DEANGELIS, PL. et al., Identification and Molecular Cloning of a Chondroitin Synthase from <i>Pasteurella multocida</i> Type F J. Biol. Chem. (2000) Vol. 275, No. 31, p. 24124-24129	1-14
A	SUGUMARAN, G. et al., Biosynthesis of Chondroitin Sulfate J. Biol. Chem. (1997) Vol. 272, No. 22, p. 14399-14403	1-14
A	TSUCHIDA, K. et al., Purification and characterization of fetal bovine serum $\beta$ -N-acetyl-D-galactosaminyltransferase and $\beta$ -D-glucuronyltransferase involved in chondroitin sulfate biosynthesis Eur. J. Biochem. (1999) Vol. 264, p. 461-467	1-14